

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal



TESIS DOCTORAL

**Lisis de paredes celulares de hongos filamentosos :
producción de protoplastos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Isabel Pérez Leblic

Madrid, 2015

Isabel Pérez Leblic

TP—
1281
—
128



x - 53 - 013277 - 0

LISIS DE PAREDES CELULARES DE HONGOS FILAMENTOSOS.
PRODUCCION DE PROTOPLASTOS.

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Isabel Pérez Leblic
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-15910-1981

LISIS DE PAREDES CELULARES DE HONGOS FILAMENTOSOS.
PRODUCCION DE PROTOPLASTOS.

Trabajo presentado por María
Isabel Pérez Leblic para la
obtención del Grado de Doc--
tor en Ciencias Biológicas,
en la Facultad de Ciencias
Biológicas de la Universidad
Complutense de Madrid.
Madrid, Junio de 1979.

Quiero expresar mi gratitud al Centro de Investigaciones Biológicas y especialmente al Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C.S.I.C. , donde he realizado el presente trabajo.

Asimismo quiero agradecer al Dr.D. Carlos Vicente -- Córdoba, catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de -- Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, -- por aceptar la ponencia de esta tesis y a la Dra.Dña. Fuensanta Reyes por la dirección de la misma.También agradezco al Dr. D.Rafael Lahoz por sus orientaciones, y a todos mis compañeros en especial a la Srta. María Teresa Raposo, por las ayudas que me han prestado en múltiples ocasiones, las cuales han hecho -- posible la realización de este trabajo.

INDICE

	<u>Página</u>
I - INTRODUCCION	1
II - MATERIALES, METODOS Y PARTE EXPERIMENTAL	16
- Microorganismos empleados	17
- Preparación de inóculos y medio de cultivo .	18
- Método para la determinación de azúcares re- ductores libres en el líquido de cultivo ...	20
- Método para la determinación de proteínas en el líquido de cultivo	25
- Preparación de soluciones tampón	28
- Valoración de enzimas líticas en el líquido de cultivo	31
- Método de determinación de glucosa. Glucosa oxidasa	48
- Determinación de carbohidratos	50
- Obtención y valoración de enzimas líticas ..	53
- Obtención de paredes celulares	55
- Método de degradación de paredes celulares.	63
- Método de producción de protoplastos	65
- Técnicas de microscopía electrónica	75
III - RESULTADOS	79

	<u>Página</u>
- <u>Penicillium oxalicum</u>	79
- <u>Neurospora crassa</u>	104
- <u>Aspergillus nidulans</u>	118
- <u>Polystictus versicolor</u>	130
- <u>Aspergillus niger</u>	143
- <u>Schizophyllum commune</u>	155
- <u>Mucor mucedo</u>	167
IV - DISCUSION	180
V - CONCLUSIONES	202
VI - BIBLIOGRAFIA	205

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

El papel que desempeña la pared celular en la estructura y comportamiento de los hongos es de gran importancia, y, con pocas excepciones, la pared más que cualquier otra parte de la célula define al hongo y le distingue de otros seres vivientes. A pesar de su constitución la pared es muy versátil, adaptándose a una amplia variedad de funciones como son: crecimiento vegetativo, reproducción, dispersión, supervivencia, penetración del huésped, etc, estando el desarrollo de un hongo íntimamente relacionado con la morfología de su pared celular.

La composición química de la pared de un hongo es tan específica que ha servido como criterio en la taxonomía y morfología de estos.

Los primeros datos sobre análisis químicos de diversas especies de setas se deben a Braconnot (1811), encontrando en todas las especies estudiadas un componente muy resistente el cual no se atacaba por bases fuertes. Esta sustancia a la que creía exclusiva de los hongos la llamó "fungine". Odier (1823) descubrió en insectos otra substan--

cia que tenía las mismas propiedades a la descubierta por Braconnot, a la cual llamó quitina, nombre aceptado desde entonces para dicha substancia, cualquiera que sea su origen.

van Wisselingh (1898) demostró la existencia de quitina en las paredes celulares de un gran número de hongos mediante un test citoquímico, basado en la conversión de quitina a quitosan por tratamiento con álcalis y posterior reacción con I_2 , produciéndose una fuerte coloración violeta sobre el tejido.

El primer investigador que utiliza la composición química de la pared celular (quitina y celulosa) como criterio en taxonomía de hongos fué Wettstein (1921). Este criterio fué revivido por Nabel (1939) clasificando nuevas especies de Chytridiales.

Hasta hace poco tiempo, los análisis para determinar otros compuestos distintos de quitina y celulosa presentaban serios inconvenientes técnicos. Tomando como ejemplo los trabajos de Thomas (1928, 1930, 1942, 1944) vemos que los micelios de los hongos eran extraídos con varios reactivos y los extractos eran analizados, por tanto las substancias extraídas podrían pertenecer tanto al citoplasma como a la pared celular. Muchos investigadores han empleado paredes preparadas químicamente, usando procedimientos en los que tiene lugar la digestión alcalina del citoplasma, como Blank (1953), Aronson y Mach-

lis (1959) y estos procedimientos pueden dar lugar a la extracción de ciertos constituyentes de la pared celular (Kreger, 1954).

Hace algunos años se han desarrollado métodos mecánicos para preparar paredes celulares puras de microorganismos, estas técnicas han dado resultado en la obtención de paredes celulares de bacterias (Salton, 1961) y han sido aplicadas también en la obtención de paredes celulares de hongos, con buenos resultados (Kreger, 1954; Crook y Johnston, 1962). A partir de este momento y con el uso de nuevos métodos físicos y cromatográficos, se ha llegado a determinar la complejidad y diversidad de la estructura de las paredes celulares de los hongos, así como su composición química.

La composición química de la pared celular puede variar completamente de una clase taxonómica a la siguiente (Bartnicki-García, 1968). La pared celular de un hongo tiene generalmente de un 80 a un 90 por ciento de polisacáridos, siendo el resto de proteínas y lípidos; algunas veces también se encuentran en la pared pigmentos (melaninas), fosfatos, iones inorgánicos, etc.

Físicamente la pared celular está formada por microfibrillas entretejidas, embebidas o cementadas por una sustancia matriz amorfa. Las microfibrillas o componentes del esqueleto de la pared de la mayoría de los hongos suelen ser de --

quitina o celulosa ,mientras que en las levaduras estas microfibrillas son generalmente glucanos no celulósicos.El cemento de unión está formado por diferentes polisacáridos como glucanos,mananos,galactanos,heteropolisacáridos y proteínas.

Según Aronson (1965) las proteínas encontradas en preparaciones de paredes celulares de hongos filamentosos, no pueden ser totalmente componentes estructurales. Parte de las proteínas de la pared son enzimas y otra parte puede ser debida a contaminación citoplasmática. Algunas proteínas están firmemente unidas a la pared aunque pueden ser separadas de ésta con extracciones drásticas (Bartnicki-García y Nickerson, 1962; Bartnicki-García, 1966; Ruiz-Herrera, 1967) .Estas proteínas son probablemente una parte integral de la estructura de la pared celular. También se han encontrado glicoproteínas en las paredes celulares de hongos filamentosos (Bartnicki-García y Reyes, 1964; Manocha y Colvin, 1967).

El papel de los lípidos en las paredes celulares de los hongos no ha sido esclarecido completamente. Hurst (1952) sugiere que los lípidos contribuyen a la rigidez de la pared celular del Saccharomyces cerevisiae .Otra posible función sería la de conferir propiedades hidrofóbicas a ciertas estructuras celulares, tales como esporangióforos y esporas. Ruiz-Herrera (1967) y Novaes-Ledien y colaboradores (1967) indican que algunos lípidos están firmemente unidos a la pared celular y pueden tener un papel estructural (Nickerson, 1963).

Los polisacáridos de las paredes celulares de los hongos están constituidos de diversos azúcares; al menos 11 monosacáridos se han encontrado que entran a formar parte de la pared, pero solamente tres, glucosa, N-acetilglucosamina y manosa se encuentran en la mayoría de los hongos. Su composición relativa varía enormemente, desde trazas en unos organismos hasta ser los componentes principales en otros. Los restantes monosacáridos se encuentran con menos frecuencia, pero generalmente en mayor o menor proporción en un grupo determinado de hongos. Así la galactosa y galactosamina en Ascomycetes, L-fucosa en Micorales y xilosa en Basidiomycetes. Ocasionalmente pequeñas cantidades de ramnosa, ribosa y arabinosa se han encontrado presentes en algunos hongos (Novaes-Ledien y colab., 1967; Brown y colab., 1965; y Johnston, 1965). También se han encontrado presentes ácidos urónicos formando parte de la pared celular (Gancedo y colab., 1966; Brown y Lindberg, 1967; Mahadevan y Tatum, 1965; Potfieter y Alexander, 1966; Skucas, 1966) siendo el ácido glucurónico el más frecuente.

La estructura fibrosa de la pared celular de los hongos fué observada por primera vez por Frey-Wyssling y Mühlethaler (1950) en Phycomycetes y fué confirmada por Roelofsen (1951) y Middlebrook y Preston (1952).

Todo lo que se conoce actualmente sobre la estructura de la pared celular de los hongos se ha puesto de manifiesto por microscopía electrónica sobre paredes sombreadas (Au/Pd)

o cortes muy finos de paredes, antes y después de haberlas sometido a fuertes tratamientos químicos o tratamientos enzimáticos.

Los tratamientos enzimáticos han llegado a esclarecer que las paredes celulares de la mayoría de los hongos están formadas por diversas capas bien definidas químicamente (Potfietor y Alexander, 1965; Mahadevan y Tatum, 1967; Manocha y Colvin, 1967; y Hunsley y Burnett, 1970). Siendo este número de capas, variable de unos hongos a otros.

La lisis de las paredes celulares de los hongos filamentosos por microorganismos o enzimas obtenidas de microorganismos ha sido estudiada en gran número de ellos (Skujins y colab., 1965; y Jones y colab., 1968). La lisis de un hongo también ocurre durante la autólisis, con sus propias enzimas líticas, las cuales pueden estar localizadas en la pared celular (Mitchell y Sabar, 1966; Polacheck y Rosenberger, 1975) o en el medio de cultivo, donde se han acumulado durante la fase autolítica del crecimiento (Ko y Lockwood, 1970; Reyes y Byrde, 1973; y Reyes y Lahoz, 1977).

La lisis de la pared celular de un hongo ha hecho posible la obtención de protoplastos (Villanueva y García-Acha, 1971), los cuales permanecen intactos en condiciones osmóticas apropiadas.

El término protoplasto ha sido usado desde 1953 por Weibull y otros investigadores, para denominar la estructura - que queda cuando células bacterianas son privadas de su pared celular. Se llaman esferoplastos si algún residuo de la pared queda sobre la célula (Brenner y colab., 1958).

La palabra protoplasto también ha sido usada para - indicar formas equivalentes en hongos (Mc Quillen, 1960). Los protoplastos de hongos generalmente emergen a través de un po^{ro} o parte de la pared atacada por enzimas líticas, pudiendo - observarse paredes celulares vacías después de haber salido - el protoplasto, ya que la lisis de la pared celular es un fenó^{meno} muy lento.

El criterio aceptado para definir los protoplastos, es la pérdida de rigidez, adoptando la forma esférica y la fra^gilidad osmótica (Villanueva, 1966).

Los métodos usados para el aislamiento de protoplas^{tos} se pueden dividir en tres grupos principales. El primero - comprende los métodos mecánicos; el segundo se basa en el uso de enzimas para disolver la pared celular y el tercero hace - uso de la inhibición de la síntesis de la pared, sin que afec^{te} a los componentes citoplasmáticos. Hay tanta literatura so^{bre} la producción de protoplastos y tan interesante que es -- preferible indicar sólo las revisiones de conjunto de Villa^{nueva} (1966); Villanueva y García Acha (1971) y Peberdy (1972, 1978).

Los protoplastos contienen todos los orgánulos propios de la célula, comportándose como tal. La importancia de los protoplastos radica en las muchas aplicaciones o usos -- que de ellos se puede hacer, como son: preparación de membranas celulares, obtención de núcleos, vacuolas, tonoplastos, mitocondrias y demás orgánulos celulares, fácil preparación de extractos celulares, estudios de sistemas osmóticos y de permeabilidad, crecimiento, resistencia a factores físicos, investigación de proteínas síntesis y localización de enzimas, modo de acción de antibióticos y agentes activos de superficie, regeneración de la pared celular y su biosíntesis, conjugación de protoplastos y formación de esporas.

La revisión que precede pone de manifiesto que -- existe una relación entre la composición química de la pared, su estructura, lisis de la misma y producción de protoplastos.

Los trabajos sobre autólisis llevados a cabo en -- nuestro laboratorio, por Reyes y colab. (1973, 1976, 1977, 1978); Lahoz y colab. (1976, 1978) y Gómez y colab. (1977) ponen de manifiesto que los grados de autólisis (pérdida de peso seco -- del micelio expresado en %) alcanzados por diversos hongos -- filamentosos, oscilan entre un 50 y un 90%, lo que indica que no solamente ha habido lisis del citoplasma sino también de

la pared celular. Las enzimas líticas necesarias para llevar a cabo esta degradación celular son excretadas al medio, o sintetizadas y excretadas al medio, durante la fase autolítica del crecimiento.

Por todo esto, la presente investigación encaminada a estudiar la degradación de las paredes celulares de hongos filamentosos con sus propias enzimas líticas y producción de protoplastos se ha planificado de la siguiente manera:

- 1º.- Elección de hongos filamentosos con diferente composición química y estructural de sus paredes celulares.
- 2º.- Grados de autólisis alcanzados, considerando - el final de la autólisis cuando no hay variación en el peso seco del micelio.
- 3º.- Obtención del complejo enzimático producido - por cada hongo y valoración de las actividades líticas existentes.
- 4º.- Obtención de paredes celulares de cada hongo. Valoración del contenido de proteínas y actividades enzimáticas residuales en las paredes.
- 5º.- Efecto de las enzimas líticas de cada hongo -

sobre paredes del mismo, obtenidas de cultivos de diferentes edades. Determinación y cuantificación de los azúcares producidos.

6º.- Estudio de la ultraestructura por microscopía electrónica (sombreado Au/Pd y cortes finos) - de paredes jóvenes (procedentes de cultivos no autolizados) antes y después de haber sido tratadas por las enzimas líticas.

7º.- Obtención de protoplastos de cada hongo con -- sus propias enzimas líticas. Determinación de -- las condiciones óptimas y cuantificación o rendimiento en protoplastos.

Los microorganismos elegidos como modelos fisiológicos para la realización del presente trabajo, han sido distintas especies de hongos filamentosos pertenecientes a las principales clases que actualmente se conocen.

De la clasificación propuesta por Ainsworth (1973), presentamos a continuación aquellos grupos de hongos filamentosos en los que se encuentran situadas las especies objeto de nuestro trabajo:

CLASE	SUBCLASE	ORDEN	FAMILIA
Zigomycetes	Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae
Ascomycetes	Plectomycetes	Eurotiales	Eurotiaceae
	Pyrenomycetes	Sphaeriales	Sordariaceae
Basidiomycetes	Hymenomycetes	Aphylllophorales	Polyporaceae
			Schizophyllaceae

Las especies que consideramos como más representativas para la consecución del mismo fueron las siguientes:

- Mucor mucedo
- Aspergillus niger
- Aspergillus nidulans
- Penicillium oxalicum
- Neurospora crassa

-Polystictus versicolor

-Schizophyllum commune

Las características principales que presentan estas especies, extraídas de la bibliografía existente, (J. Webster, -- 1970; Gola, Negri, 1965) son las siguientes:

Mucor mucedo. -

Especie perteneciente a la familia - Mucoraceae que se caracteriza por estar ampliamente distribuido en el suelo, siendo saprófito o parásito de frutas y animales incluido el hombre al que puede producir enfermedades (mucormicosis).

En condiciones aerobias su crecimiento es filamentoso presentando un micelio muy ramificado cuyas hifas en la fase juvenil carecen de septos, poseyendo en su interior abundantes núcleos de pequeño tamaño. Cuando estas hifas alcanzan un cierto grado de desarrollo, de ellas emergen pequeñas ramitas que son los esporangióforos en cuyos extremos se forman los - esporangios de forma esférica globosa y de color pardo claro.

Asexualmente se multiplican por formación de esporas no móviles pudiendo ser endosporas o exosporas (conidios). Por reproducción sexual dan lugar a la formación de zigosporas, protegidas de una capa gruesa verrugosa.

Sus paredes celulares presentan como componentes --

principales quitina y quitosan junto con otros polisacáridos; aminozúcares y azúcares tales como glucosa y galactosa, y -- otros componentes como proteínas y lípidos.

En condiciones anaerobias, especialmente en presencia de CO_2 , puede crecer en forma levaduriforme revirtiendo -- nuevamente a la forma filamentosa cuando crece en presencia -- de oxígeno.

Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, Penici---
llium oxalicum.--

Estas tres especies de hongos pertenecen a la familia Fuotiaceae, que incluye géneros de gran -- importancia económica por su utilización en procesos fermenta -- tivos y como productores de antibióticos.

Morfológicamente se caracterizan por formar micelio muy abundante cuyas hifas son tabicadas con células uninuclea -- das presentando crecimiento apical. Se multiplican sexualmente dando lugar a esporas que se forman en el interior de una estructura de forma sacular que recibe el nombre de asca. -- Las ascosporas se encuentran en un número que varía de 4 a 8 (que es el más frecuente). Las ascas se disponen en cuerpos especiales, los conidióforos que adoptan distinta forma se -- gún el género de que se trate (forma de copa en Aspergillus, pincel en Penicillium). Asexualmente se reproducen mediante la formación de distintos tipos de estructuras como conidios y plicidios. Estos hongos en condiciones especiales dan lu--

gar a formas de resistencia que son los esclerocios.

Sus paredes celulares están formadas por un esqueleto microfibrilar de naturaleza quitinásica, formado además por aminoazúcares y azúcares tales como glucosamina, manosa y glucosa junto con proteínas.

Neurospora crassa.-

Ascomiceto perteneciente a la familia Sordariaceae, de gran importancia por su aplicación a estudios de tipo genético y bioquímico debido a las peculiares características que presenta, como son: requerimientos nutricionales sencillos, crecimiento y reproducción sexual rápidos, facilidad de mutación y análisis sencillo de sus ascas.

Su micelio es heterotálico, muy abundante y de color anaranjado, con hifas tabicadas que poseen células uninucleadas. Las ascosporas se encuentran en número de 8 dentro de las ascas, siendo viables durante mucho tiempo.

Polytictus versicolor y Schizophyllum commune.-

Estos Basidiomicetos pertenecen respectivamente a las familias Polyporaceae y Schizophyllaceae.

Presentan como característica principal el que sus esporas se forman en basidios (basidiosporas), estructuras equivalentes al asca de los Actinomicetos, diferenciándose de la de estos en que una vez formadas las esporas (exosporas) en

el basidio, se disponen en el exterior de este, en contraposición con las endosporas del asca. Las basidiosporas se encuentran en número de cuatro y son el resultado de un proceso de reproducción sexual. La presencia o no de tabiques transversales en los basidios, está considerada como un carácter de importancia taxonómica, presentándose el basidio sin dividir en estas dos especies.

El micelio que se forma después de la germinación es multinucleado, transformándose en segmentos uninucleados -- por la posterior aparición de septos que tienen forma discontinua. Es de resaltar que este micelio dicariótico presenta en cada septo una protuberancia lateral en forma de abrazadera o grapa, sirviendo como dispositivo para el intercambio nuclear. Presenta cuerpos fructíferos muy resistentes a la desecación.

MATERIALES, METODOS Y PARTE EXPERIMENTAL

MICROORGANISMOS EMPLEADOS

Los microorganismos utilizados para realizar el presente trabajo han sido:

Mucor mucedo - C.B.S. 109.16, adquirido del Centraalbureau voor Schimmel Cultures, Baarn (Holanda) .

Aspergillus niger - (van Tieghem) C.B.S. 120.49, de igual procedencia que el anterior.

Aspergillus nidulans - C.E.C.T. 2544, adquirido de la Colección Española de Cultivos Tipo - Facultad de Ciencias,-- Universidad de Salamanca.

Penicillium oxalicum - I.J.F.M. 1331, de la colección del Instituto "Jaime Ferrán" - de Microbiología del C.S.I.C.

Neurospora crassa - C.E.C.T. 2254, procedente de la - Colección Española de Cultivos Tipo - Facultad de Ciencias, Universidad de Bilbao.

Polystictus versicolor - C.B.S. 255.10.

Schizophyllum commune - C.E.C.T. 2650.

Todos estos microorganismos, se mantenían en el laboratorio mediante resiembras en tubos de agar malta inclinados, excepto Mucor mucedo que se mantenía en medio patata dextrosa.

PREPARACION DE LOS INOCULOS

Una vez que los cultivos inclinados habían crecido convenientemente (de 8 a 10 días), se preparaba una suspensión de esporas o de micelio en condiciones estériles añadiendo una cierta cantidad de agua destilada (10ml.), frotando ligeramente la superficie del cultivo con el asa de siembra.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio empleado para el cultivo de las especies citadas, tiene la composición siguiente:

Glucosa - - - - -	10 g/l
Tartrato amónico - - - - -	2 g/l
P O ₄ H ₂ K - - - - -	1 g/l
S O ₄ Mg. 7H ₂ O - - - - -	0,5 g/l
Cl K - - - - -	0,5 g/l
Extracto de levadura - - - - -	1 g/l
Elementos traza - - - - -	1 ml/l

Asimismo, la solución de elementos traza está compuesta :

B ₄ O ₇ Na ₂ . 10 H ₂ O - - - - -	100 mg/l
---	----------

$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - - - - - 70 mg/l
 $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - - - - - 50 mg/l
 $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - - - - - 10 mg/l
 $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - - - - - 10 mg/l
 $\text{MgO} \cdot 24(\text{NH}_4)_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - - - - 10 mg/l

Para preparar este medio, se disuelve la glucosa en agua destilada y a continuación se disuelven todas las demás sales, con excepción del $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, que se añade disuelto y en último lugar para evitar precipitaciones. A la mezcla se le añaden la disolución de elementos traza. Finalmente se completa hasta un litro con agua destilada. El pH del medio era de 5,5.

ESTERILIZACION DEL MEDIO

El método empleado fué el de la Tyndalización, el cual consiste en someter al medio de cultivo contenido en los matraces a una corriente de vapor durante media hora, tres días consecutivos.

METODO DE CULTIVO

Los matraces fueron incubados en cultivo estacionario a 25°C en la obscuridad, en una estufa modelo "Selecta".

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES LIBRES EN EL LIQUIDO
DE CULTIVO

Método de Somogyi (1945) en combinación con el Método de Nelson (1944).

Fundamento .-

Este método se basa en la oxidación de los azúcares y sustancias reductoras mediante compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina.

Las sustancias reductoras son oxidadas por el SO_4Cu , el cual se reduce a óxido de cobre, rojo, que reacciona con el reactivo Nelson formando un complejo de color azul. La intensidad de color depende de la cantidad de cobre reducido, o lo que es lo mismo, de la cantidad de sustancias reductoras existentes.

Este color se mide espectrofotométricamente a 540nm. y dicha lectura se compara con la de un patrón de concentración conocida de glucosa.

Este método reúne las siguientes ventajas:

- 1º Es suficientemente alcalino para la determinación de la maltosa y otros azúcares de pequeña actividad.
- 2º Los reactivos son estables.
- 3º Puede usarse entre límites muy amplios, desde 10 microgramos hasta 300 microgramos de glucosa u otras sustancias de equivalente poder reductor.

Reactivos.-

Reactivo alcalino de Somogyi:

- 1º.- 24 gramos de carbonato sódico anhidro más 12 gramos de tartrato sódico potásico (sal de Rochelle), se disuelven en 250 ml. de agua -- destilada .
- 2º.- 4 gramos de sulfato cúprico hidratado ($5 H_2O$) se disuelven en 40 ml. de agua destilada. A -- continuación, se agrega agitando, la primera solución.
- 3º.- Sobre esta mezcla, se añaden lentamente 16 g. de bicarbonato sódico.
- 4º.- 180 gramos de sulfato sódico anhidro se di--suelven en 500 ml. de agua destilada calien--te y se hierve para expulsar el aire. Una vez que se enfría se le añade la mezcla anterior y se completa el volumen hasta 1000 ml. con agua destilada. El preparado se deja en la -- obscuridad a $30^{\circ}C$, y al cabo de una semana se filtra y se guarda en frasco tapado.

Reactivo de Nelson:

- 1º.- A 25 gramos de molibdato amónico disueltos en 450 ml. de agua destilada, se añaden cui--dadosamente 21 ml. de ácido sulfúrico con--centrado, agitando al mismo tiempo.
- 2º.- Se disuelven tres gramos de arseniato sódico en 25 ml. de agua destilada. A continua--

ción se mezclan ambas soluciones y el preparado resultante se guarda en la estufa a 37°C durante 48 h. Una vez transcurrido este tiempo, el reactivo se guarda en frasco tapado.

Procedimiento.-

Una cantidad conocida de líquido problema, se lleva hasta 1 ml. con agua destilada, y se añade 1 ml. de reactivo de Somogyi. Se agita y se calienta al baño maría, dejándolo hervir durante 15 minutos. A continuación se enfría y se agrega 1 ml. de reactivo Nelson. Se agita de nuevo y se completa el volumen hasta 15 ml. con agua destilada. El color que aparece en los tubos permanece estable durante horas. La absorción se mide en un espectrofotómetro Unicam, modelo S P 500, a una longitud de onda de 540 nm. Este método también se usó reduciendo a un quinto cada uno de los volúmenes totales.

Como el desarrollo de color depende de varios factores, tales como el tiempo e intensidad de calentamiento, es conveniente asegurarse que estos han sido correctos. Para ello al mismo tiempo que se realiza el ensayo con el problema, se hace también con un patrón de glucosa y se llevan blancos de reactivo y de problema.

Solución patrón de glucosa.-

Se prepara una solución 1mM de glucosa Analar. Para ello se disuelven 18,0 mg. de este compuesto y se llevan

a 100 ml. con agua destilada en matraz aforado. Se conserva congelado en nevera. Cuando es necesario el patrón de glucosa se disuelve en el tampón apropiado.

Curva patrón de glucosa.-

A partir de la solución patrón de glucosa cuya preparación se acaba de describir, se toman distintos volúmenes y se completan con agua destilada hasta 1 ml., siguiendo a continuación el método indicado.

La curva patrón se representa gráficamente llevando en abscisas las distintas concentraciones de glucosa tomadas y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas al leer a la longitud de onda de 540 nm. (Fig. 1)

<u>Volúmen (ml)</u>	<u>Concentración (μmoles)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,0	0,0	0,013
0,1	0,1	0,082
0,2	0,2	0,160
0,3	0,3	0,230
0,4	0,4	0,313
0,5	0,5	0,395
0,6	0,6	0,462
0,7	0,7	0,542
0,8	0,8	0,579
0,9	0,9	0,691
1,0	1,0	0,729

CURVA PATRON DE GLUCOSA

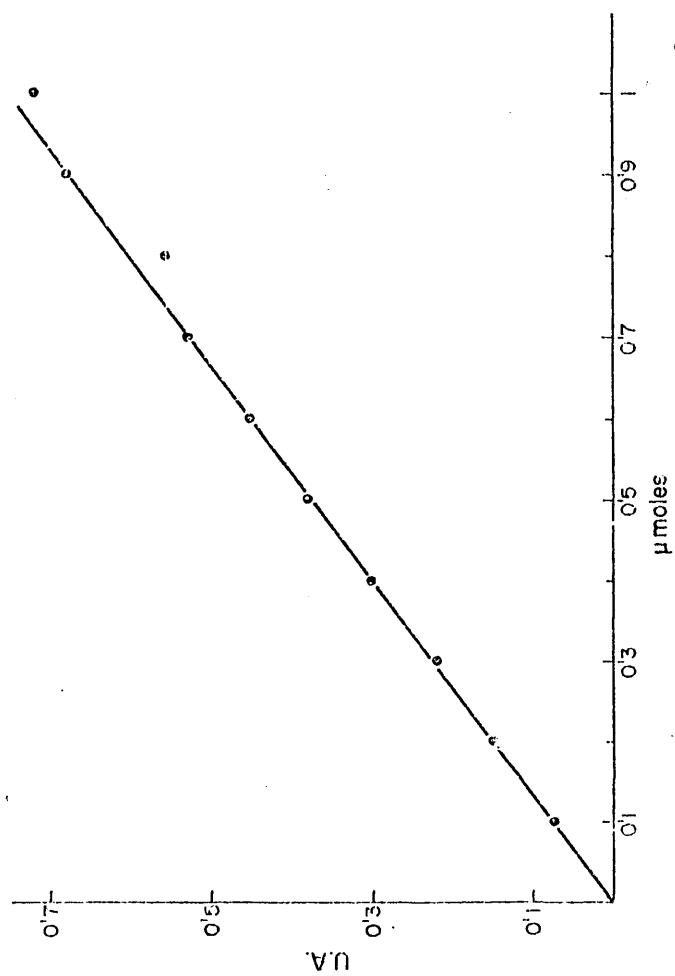


FIG. 1

DETERMINACION DE PROTEINAS EN EL LIQUIDO DE CULTIVO

Método de Lowry y col. (1951).

Reactivos empleados.-

- Reactivo A : CO_3Na_2 al 2% en NaOH 0,1 N.
- Reactivo B : $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 0,5%.
- Reactivo B' : Tartrato sódico potásico al 1%.
- Reactivo C : Solución alcalina de cobre. Se mezclan 50 ml. de reactivo A con 0,5 ml. de reactivo B y 0,5 ml. de B'.
- Reactivo D : Reactivo de Folin-Ciocalteu (1929) diluido (1 : 1) con agua destilada.

Procedimiento.-

Tomando distintos volúmenes del líquido problema, se completan a 0,5 ml. con agua destilada. A continuación se añaden 2,5 ml. del reactivo C y se dejan los tubos en estufa a 37° C durante 20 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo se añade a cada tubo 0,25 ml. del reactivo Folin-Ciocalteu diluido (1 : 1) con agua destilada. Los tubos se ponen a incubar de nuevo en estufa a 37° C. otros 20 minutos. La densidad óptica se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

En cada determinación de proteínas se coloca un tubo patrón con una cantidad determinada de la solución patrón de proteínas junto con un tubo de blanco de reacti

va.

Solución patrón de proteínas.-

Se prepara una solución patrón de albúmina bovina cristalizada (Armour, Chicago, U.S.A.), que contenga - 1 mg/ml. Para ello se pesan 100 mg. de albúmina bovina y se disuelven y llevan a 100 ml con agua destilada.

La solución así preparada se conserva congelada en nevera.

Curva patrón de proteínas.-

A partir de la solución patrón de albúmina bovina anterior, se toman distintos volúmenes y se procede como se ha descrito en el método.

Representando gráficamente en abscisas las distintas concentraciones de albúmina tomadas y en ordenadas las unidades de absorción, obtenemos la curva patrón de proteínas. (Fig. 2).

CURVA PATRON DE PROTEINAS

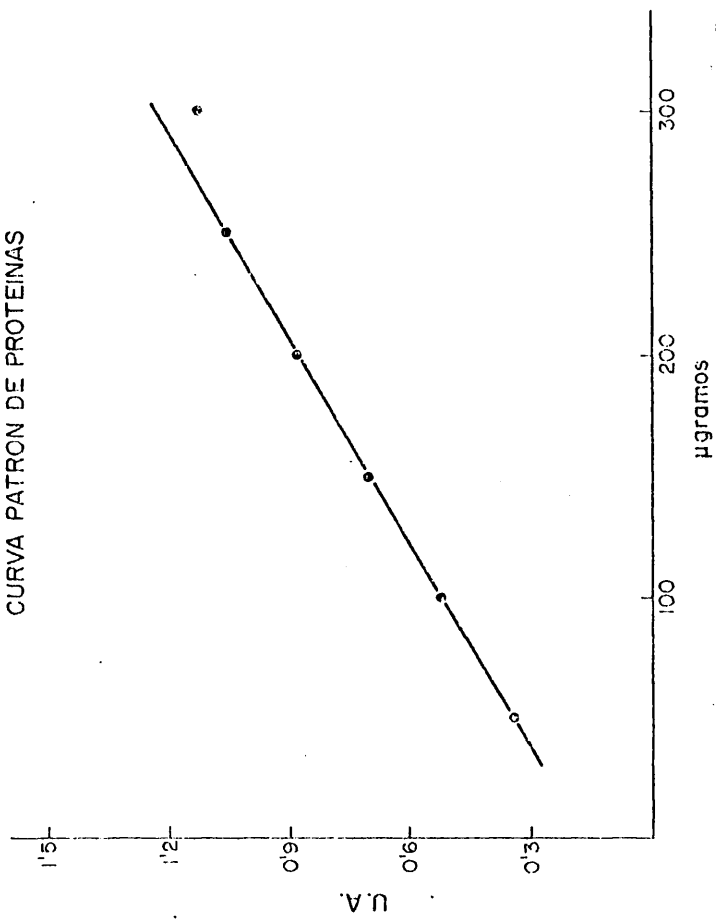


FIG. 2

<u>Volumen (ml)</u>	<u>Concentración (ug)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,00	0	0,054
0,05	50	0,338
0,10	100	0,525
0,15	150	0,703
0,20	200	0,881
0,25	250	1,056
0,30	300	1,124
0,35	350	1,279
0,40	400	1,455
0,45	450	1,470
0,50	500	1,578

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES TAMPON

Tampón de Citrato-Fosfato-Borato.-

Teorell y Stenhagen (1938). Válido para un rango de pH entre 2 y 12 unidades.

Reactivos empleados:

- Solución A: Se pesan 7 g. de ácido cítrico hidratado y se disuelven en 100 ml de agua destilada. Por otro lado se disuelven 2 ml de ácido fosfórico al 85% en 100 ml de agua destilada y se añaden a la solución anterior. A esta mezcla se le agregan 3,54 g. de ácido ortobórico cristalizado y 343ml de una solución de NaOH 1N. diluyendo el total hasta 1 litro con agua destilada.

- Solución B: Acido clorhídrico 0,1 N.

Para obtener la solución tamponada a distintos pH, se mezclan:

20 ml de solución A con X ml de solución B, llevándose a 100 ml con agua destilada. La cantidad X viene dada en las tablas (Tablas científicas-Documenta Geigy J.R. - Geigy, S.A., Basilea, Suiza, 1965).

Para obtener el tampón de pH 5,5 y molaridad 50mM, se mezclan 20 ml de solución A con 42 ml de solución B y se lleva a 100 ml con agua destilada, comprobando el pH en un medidor eléctrico de pH (Beckman, modelo "Zeromatic-S.S.3"). Si el pH no sale exacto, se corrige con una pequeña adición de solución A o B según los casos, para obtener el pH deseado. Para obtener la solución 50 mM, llevamos la mezcla a 200 ml con agua destilada.

Tampón de Borato de Clark y Lubs.- (1917)

Válido para un rango de pH entre 7,8 y 10,0 unidades.

- Solución A : Acido bórico 0,1 M en cloruro potásico 0,1 M (6,2 g. de BO_3H_3 y 7,46 g. de ClK en 1 litro de agua destilada).

- Solución B : Hidróxido sódico 0,1 N.

Para obtener un pH de 9,8 mezclamos 50 ml de solución A con 40,8 ml de solución B, completando a 100 ml

con agua destilada.

Tampón de Acetato de Malpole.- (1914)

Válido para un rango de pH entre 3,6 y 5,6 unidades.

- Solución A : Acido acético 0,2 M. (12g. de -- ácido acético en un litro de agua destilada o 11,4 ml por litro de agua).
- Solución B : Acetato sódico 0,2 M. (16,4 g. de acetato sódico anhidro en un litro de agua destilada o 27,2 g. de acetato sódico con 3 moléculas de agua).

Para obtener un pH de 5,5 se mezclan 6,8 ml de la solución A con 42,7 ml de la solución B, completando el volumen hasta 100 ml con agua destilada. La concentración que posee este tampón así preparado es de 0,1 M.

VALORACION DE ENZIMAS LITICAS EN EL LIQUIDO DE CULTIVO

β -N-Acetilglucosaminidasa.- (E.C.3.2.1.30)

(β -2-acetamido-2-deoxi-D-glucósido. acetamido deoxi-hidrolasa). Hidroliza los β -fenol-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucósidos en fenol más 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa.

Método de Wollen (1961).

Reactivos empleados:

- Tampón de Clark y Lubs de pH 9,8.
- Tampón de citrato - fosfato - borato de pH 5,5.
- Sustrato.

Preparación del sustrato de la β -N-Acetilglucosaminidasa.-

Se prepara una solución 0,45mM, para lo cual se pesan 15,2 mg. de p-nitrofenil-2-acetamido -2-deoxi- β -D- glucopiranosido de fórmula empírica $C_{14}H_{18}N_2O_8$ y peso molecular 342,30 se disuelven en 100 ml. de tampón de citrato-fosfato-borato de pH 5,5 50mM. Este sustrato se conserva -- congelado y en frasco tapado.

La actividad de la enzima se sigue por la hidrólisis del p-nitrofenol-2-acetamido-2-denxi- β -D-glucopiranosido.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de p-nitrofenol por minuto.

Procedimiento.-

0,1 ml. del líquido de cultivo con 0,9 ml. del sustrato se incuban a 37°C un tiempo determinado, llevando también blancos de líquido de cultivo y sustrato. La reacción se para por la adición de 2 ml. de tampón de borato de Clark y Lubs de pH 9,8. El nitrofenol liberado, desarrolla un color amarillo, leyéndose en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Para poder calcular la actividad de la enzima que corresponde a una determinada lectura, es necesario hacer previamente una curva patrón de p-nitrofenol.

Curva patrón de p-nitrofenol.-

Se prepara una solución 2mM (27,8 mg en 100 ml. de agua destilada), a partir de la cual se hacen diluciones para cubrir un amplio rango de concentraciones y se representa gráficamente llevando en abscisas las distintas concentraciones de p-nitrofenol tomadas y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas. (Fig. 3).

Solución A : Se toman 0,5 ml. de la solución de p-nitrofenol 2 mM. y se diluyen a 10 ml. con agua destilada.

Solución B : Un ml. de la solución 2mM se diluye con agua destilada hasta 10 ml.

Solución C : 2 ml. de la solución 2mM se diluyen hasta 10 ml. con agua destilada.

CURVA PATRON DE P-NITROFENOL

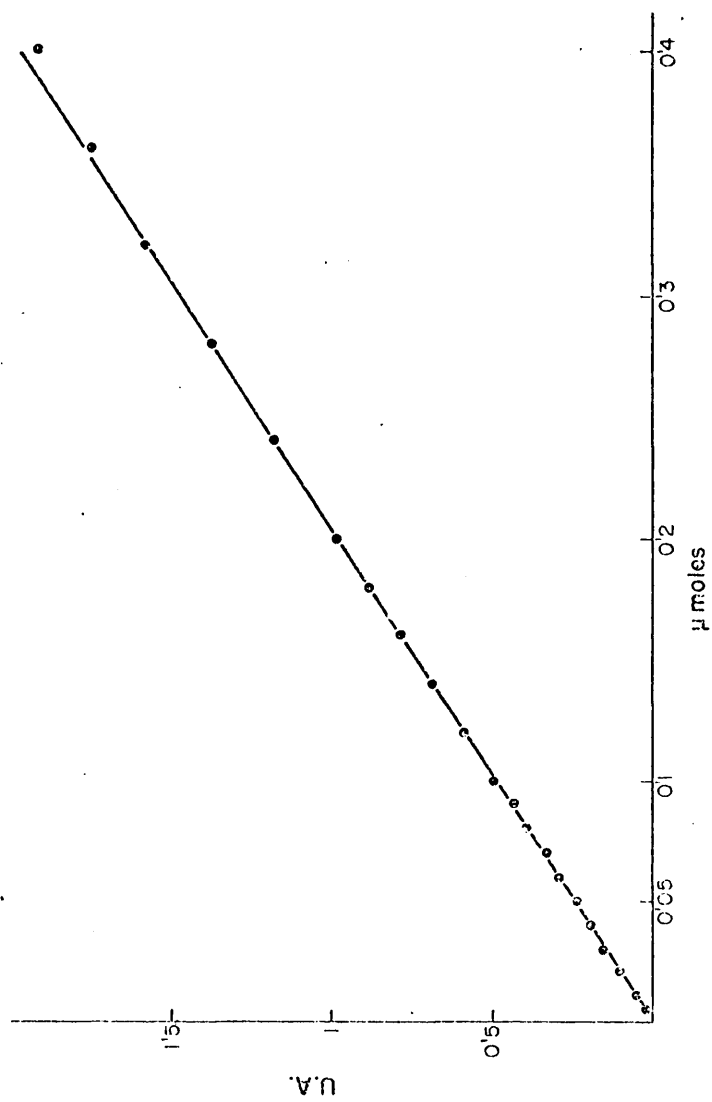


FIG. 3

<u>Volumen</u> (ml)	<u>Concentración</u> (μ moles)	<u>Lectura</u> (U.A.)
A: 0,05	0,005	0,02
0,10	0,010	0,045
0,20	0,020	0,092
0,30	0,030	0,137
0,40	0,040	0,185
0,50	0,050	0,230
0,60	0,060	0,290
0,70	0,070	0,340
0,80	0,080	0,390
0,90	0,090	0,430
1,00	0,10	0,480
B: 0,5	0,10	0,490
0,6	0,12	0,586
0,7	0,14	0,680
0,8	0,16	0,780
0,9	0,18	0,880
C: 0,5	0,20	0,97
0,6	0,24	1,18
0,7	0,28	1,37
0,8	0,32	1,58
0,9	0,36	1,75
1,0	0,40	1,92

Quitinasa.- (E.C.3.2.1.14.)

(β -(1 - 4) poli-N-acetilglucosaminidasa). Hidroliza enlaces β -(1,4)-acetamido -2- deoxi -D- glucósido en la quitina y - quitodextrina.

La actividad de esta enzima se valora por la liberación de N-Acetilglucosamina producida al hidrolizar la quitina coloidal.

Una unidad de actividad quitinásica es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de N-Acetilglucosamina por minuto.

Reactivos empleados.-

- Solución de borato sódico saturada.
- Reactivo de Ehrlich : 2 g. de p-dimetil amino -- benzaldehído disueltos en 100 ml. de ácido acético glacial y 5 ml. de ClH concentrado.
- Acido acético glacial.
- Sustrato : quitina coloidal.

Obtención de quitina de gambas.-

Método de Jeuniaux (1966).

- 1- Los caparazones de gambas se tienen un par de horas lavándose con un detergente para eliminar las partículas residuales.
- 2- Se lavan varias veces por centrifugación con agua destilada hasta eliminar completamente el detergente .
- 3- Se trata con ClH 1 N., agregando poco a poco y con agita-

ción hasta que deje de desprender CO_2 , lo cual nos indica una eliminación total del carbonato que contiene.

4- Lavar con agua nuevamente.

5- Se mantiene a 100°C al baño maría, con NaOH 0,5 N. durante media hora. El hidróxido sódico extrae casi todo el pigmento y la quitina queda de color sonrosado.

6- Lavar por centrifugación hasta eliminar la sosa.

7- Tratar con MnO_4K 0,5 % a 60°C durante 20 minutos. La materia orgánica se pone marrón.

8- Lavar hasta la desaparición del MnO_4K .

9- Tratar con $\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$ a media saturación (como agente de blanquear).

10- Se lava hasta la desaparición del piro sulfito.

11- Lavar con agua hirviendo para separar la arenilla que pudiera contener, repitiendo esta operación hasta la total eliminación de ésta.

12- Tratar media hora con alcohol para extraer los lípidos.

13- Lavar con agua destilada.

14- Se tritura en medio acuoso con una trituradora (Omni-mixer).

15- Centrifugar.

16- Lavar con acetona y secar.

Preparación de quitina coloidal.-

A 200 mg. de quitina se añade una mezcla de 5 ml. - de agua y 6,4 ml. de ácido sulfúrico concentrado, agitando y - enfriando.

Una vez disuelta la quitina se añade agitando a 100 ml. de etanol acuoso frío al 50 %.

La quitina precipita, se centrifuga y se lava con - agua destilada fría hasta que el pH sea aproximadamente de 5, después se centrifuga de nuevo y se recoge el precipitado. Esta masa amorfa se guarda a 4°C para preparar una suspensión - en el momento oportuno.

Curva de peso seco.-

Se utiliza para determinar la cantidad de quitina.-

Se prepara una suspensión de quitina coloidal en agua destilada. Se cogen 0,5 ml. y 1 ml. y se ponen en dos pesas sustancias previamente taradas. Se ponen a secar en estufa a - 70°C durante 24 h.; a continuación se pasan a un desecador -- hasta alcanzar peso constante y se vuelven a pesar. La diferencia de peso nos da los microgramos por mililitro de quitina que hay en esta suspensión.

De esta suspensión se toman diversos volúmenes y se llevan a 3 ml. con agua destilada, leyendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.. La curva se representa gráficamente, llevando en abscisas los microgramos de quitina y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas. (Fig.

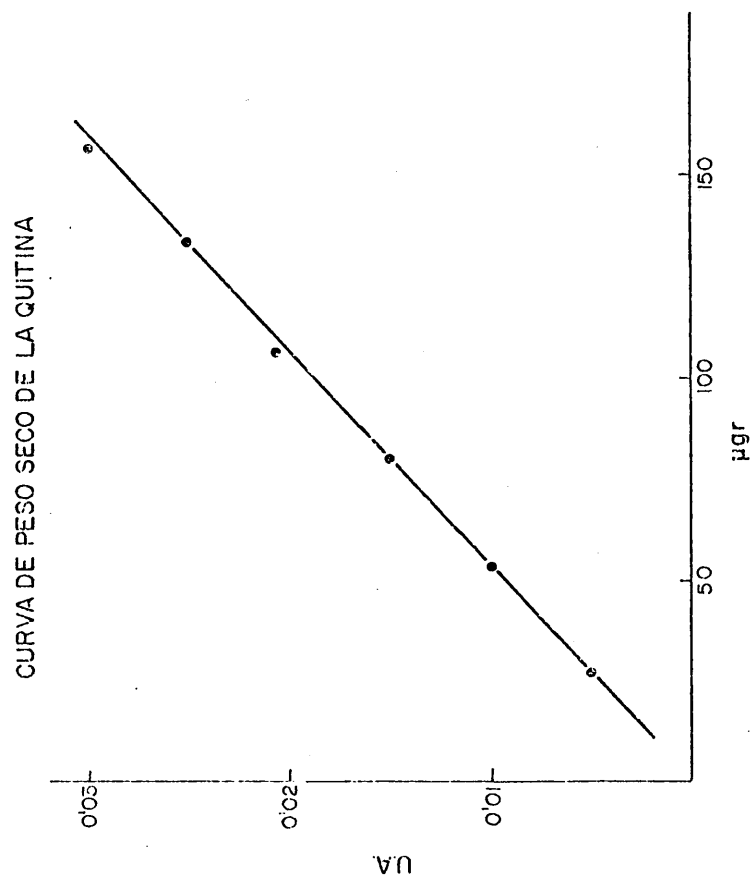


FIG. 4

<u>Volumen</u> (ml)	<u>Concentración</u> (μ g)	<u>Lectura</u> (U.A.)
0,2	26,7	0,005
0,4	53,3	0,010
0,6	80,0	0,015
0,8	106,7	0,021
1,0	133,3	0,025
1,2	156,0	0,030

Adaptación del método.-

A la enzima (1 ml. del líquido de cultivo) se le añade 1 ml. de la suspensión coloidal de quitina disuelta en - tampón de citrato-fosfato-borato de pH 5,5 y 0,05 M., que -- contiene aproximadamente 100 μ g. de quitina. Esta concentra- ción la obtenemos con ayuda de la gráfica anterior.

La enzima más la solución de quitina, se incuban a 37°C durante un tiempo determinado. A continuación se centri fuga o filtra para eliminar la quitina restante y parar la - reacción.

Una unidad de actividad quitinásica es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de N-Acetilglucosamina por minuto.

Valoración de N-Acetilglucosamina.-

Método de Tracey (1934).

De una solución que contiene N-acetilglucosamina, se toman 0,3 ml. y se añaden 0,1 ml. de una solución satura da de borato sódico, calentando a ebullición durante 7 minu

tos. Se deja enfriar y se añaden 3 ml. de ácido acético glacial más 0,3 ml. de reactivo de Ehrlich. Se deja una hora a temperatura ambiente para que se desarrolle un color violeta que será más o menos intenso dependiendo de la cantidad de N-acetilglucosamina existente. Se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Junto con el tubo problema se llevan siempre de forma paralela un patrón y blancos de reactivo y problema.

Curva patrón de N-Acetilglucosamina.-

A partir de la solución patrón de N-acetilglucosamina (2,21 mg. hasta 100 ml. en agua destilada), se toman distintos volúmenes y se sigue el método anterior.

Representamos gráficamente la curva patrón llevando en abscisas las distintas concentraciones tomadas y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas. (Fig. 5)

<u>Volumen (ml)</u>	<u>Concentración (μmoles)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,05	0,005	0,01
0,10	0,010	0,03
0,15	0,015	0,06
0,20	0,020	0,075
0,25	0,025	0,095
0,30	0,030	0,108

40 bis

Reactivos empleados.-

- 1- Solución de borato sódico saturada.
- 2- Reactivo de Ehrlich: 2 g. de p-dimetil-amino benzaldehído di
sueitos en 100 ml de ácido acético glacial y 5 ml de ClH con
centrado. Se guarda en frasco tapado.
- 3- Acido acético glacial.

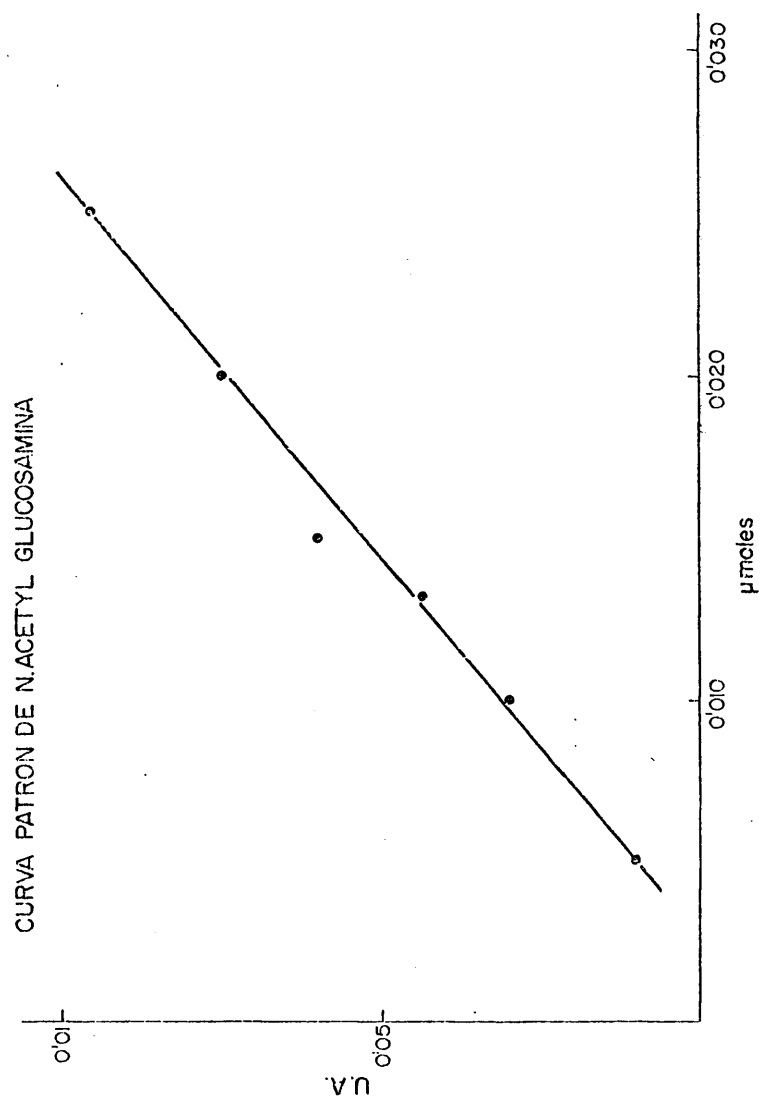


FIG. 5

Valoración de la Fosfatasa.-

(Ortofosfato monoester fosfohidrolasa). Hidroliza los monoesteres ortofosfóricos en alcohol y ortofosfato.

Método de Brightwell y Tappel (1968).

Una unidad de actividad fosfatásica es la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

Fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2.) .-

El sustrato utilizado fué el 4- nitrofenil ortofosfato disódico 3 mM disuelto en tampón de citrato-fosfato-borato 0,1 M. pH 3,5. Se guarda en frasco tapado en nevera.

Fosfatasa alcalina (E.C. 3.1.3.1.) .-

El sustrato utilizado fué el p-nitrofenil ortofosfato disódico 4 mM, disuelto en tampón de citrato-fosfato-borato 0,1 M, pH 9,5. Se guarda en frasco tapado en nevera.

Procedimiento .-

Se incubó 0,1 ml de líquido de cultivo con 0,9 ml - de sustrato a 37°C. durante un tiempo determinado, llevando - simultáneamente blancos de líquido de cultivo y de sustrato. La reacción se para con la adición de 2 ml del tampón de --- Clark y Lubs de pH 9,8.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de p-nitrofenol liberada, la cual se determina colorimétricamente , leyéndose en el espectrofotómetro a 420 nm. Se hace referencia a la curva patrón de p-nitrofenol anteriormente -- indicada.

β (1 - 3) Glucanasa.- (E.C. 3.2.1.6.)

(β (1 - 3) glucan, glucanohidrolasa). Hidroliza enlaces β (1-3) glucano adyacentes.

Su actividad se determina por el método basado en el de Mc Lellan (1970).

Sustrato : Laminarina

Se prepara una solución de laminarina a una concentración final de 1 mg/0,9 ml en tampón de citrato-fosfato-borato - 50 mM a pH 5,5. A continuación para ayudar a su disolución, se calienta a 50°C. a baño maría, repitiendo esta operación siempre en el momento de usarla.

Procedimiento.-

De este sustrato así preparado se ponen a incubar, - 0,9 ml con 0,1 ml de la enzima a 37°C. durante un tiempo variable, llevando paralelamente con el problema, blancos de líquido de cultivo y de sustrato.

La actividad de esta enzima se determina por la liberación de glucosa, la cual se mide siguiendo el método de Somogyi y Nelson, ya explicado.

Una unidad de actividad glucanásica se define como - la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de glucosa por minuto.

Invertasa (E.C. 3.2.1.26.)

(β - D - fructofuranósido fructohidrolasa). Hidroliza β - D-fructofuranósidos en glucosa más D - fructosa.

Método de Metzenberg (1962)

Sustrato .- Sacarosa

Se prepara una solución que contenga 1 mg/ml , después de diluirla con el líquido metabólico (enzima), es decir una solución que contenga 1 mg/0,9ml, para lo cual se pesan - 55 mg. de sacarosa y se disuelven en 50 ml de tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y de pH 5,5.

Procedimiento.-

La presencia de invertasa en el líquido de cultivo se mide por la hidrólisis de la sacarosa.

Un volumen de 0,9 ml de la solución de sacarosa se incuban con la enzima (0,1 ml de líquido de cultivo) a 37°C.- durante el tiempo conveniente para que se produzca la reacción.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad - de glucosa liberada, la cual se determina colorimétricamente, - valorándola por el método de Somogyi y Nelson.

Celulasa (E.C. 3.2.1.4.)

(β -(1 - 4) glucano, glucanohidrolasa). Hidroliza enlaces --- β (1 - 4) glucano en celulosa.

Método de Trager (1932) y Ziesse (1931)

El sustrato empleado fué carboximetil celulosa sódica.

ca (1 mg/ml final) disuelta en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM, pH 5,5.

Se sigue el mismo método que en las enzimas anteriormente expuestas, midiendo la cantidad de glucosa liberada por el método de Somogyi y Nelson.

Poligalacturonidasa (E.C. 3.2.1.15.)

(Poli ~~α~~ - (1 - 4) galacturónido, glucano hidrolasa). Hidroliza enlaces (1 - 4) D - galacturónido en pectinas y otros galacturónidos.

Método de Archer y Fielding (1975)

El sustrato empleado fué pectina de manzana (Fluka, Suiza) a una concentración final de 1 mg. por ml en tampón de citrato-fosfato-borato 50 mM pH 5,5.

Se sigue el mismo procedimiento que en las enzimas anteriores, midiendo la cantidad de glucosa por el método de Somogyi y Nelson.

α - Amilasa (E.C. 3.3.1.1.)

(α - (1 - 4) - glucan - 4 - glucanohidrolasa). Hidroliza enlaces de (1 - 4) glucano en polisacáridos conteniendo tres o más unidades de D - glucosa con enlaces (1 - 4).

Método de Summer y Howell (1935)

El sustrato empleado fué almidón soluble (1 mg en 0,9 ml) en tampón de citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5. Este sustrato debía calentarse a 80°C. para ayudar a su diso-

lución en el momento de su empleo.

Para la valoración de la glucosa liberada se sigue igual método que en las anteriores.

β - 1,6 Glucanasa.- (E.C.3.2.1.6.)

(β - (1-6) glucano, glucanohidrolasa). Hidroliza enlaces --
 β - (1-6) glucano adyacentes.

El sustrato empleado fué el Pustulan. Se prepara una solución de este sustrato, a una concentración final de 1 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato, 50 mM y pH 5,5.

La actividad de esta enzima se determina por la -- cantidad de glucosa liberada, siguiendo el método de Somogyi y Nelson.

β - 1,4 Glucanasa.- (E. C. 3. 2. 1. 6.)

(β - (1-4) glucano, glucanohidrolasa). Hidroliza enlaces ---
 β - 1,4 glucano adyacentes a β - 1,3.

Sustrato: Lichenan

Se prepara una suspensión de Lichenan (Koch-Light), a una concentración final de 1 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato, 50 mM y pH 5,5.

La actividad de esta enzima se determina por la -- cantidad de glucosa liberada, según el método de Somogyi y -- Nelson.

α - 1,3 glucanasa.-

Sustrato: α - 1,3 glucano, obtenido de paredes de --

Aspergillus nidulans, por el método de Zonneveld (1971). --

Se prepara una solución de este glucano en estado coloidal, en tampón de citrato-fosfato-borato, 50 mM y pH 5,5, - dándonos una densidad óptica de 0,1 a una longitud de onda de 660 nm. correspondientes a 204 μ g/ml.

La actividad de la enzima se determina por la cantidad de glucosa liberada, según el método de Somogyi y Nelson.

Dextranasa.- (E.C. 3.2.1.11.)

(α - (1-6) glucan, 6- glucanohidrolasa). Hidroliza enlaces α -1,6 glucano adyacentes.

Sustrato: Dextrano

Se prepara una solución de dextrano T₁₀ (pm.10.000) - a una concentración final de 1 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato de pH 5,5 , 50 mM.

La actividad de esta enzima se determina por la cantidad de glucosa liberada, siguiendo el método de Somoyi y Nelson.

DETERMINACION DE GLUCOSA. GLUCOSA OXIDASA.-

Reactivo de glucosa oxidasa.- (De la Fuente y Sola, comunicación personal).

Solución 0,4 mM de Cl_2Mg en tampón de fosfato pH 6,5 50 mM, que contiene por ml : 0,4 μg . de Triton X-100,-- 100 μg . de O-dianisidina, 5,4 U de glucosa oxidasa y 3 U de peroxidasa (ambas enzimas de Boehringer, grado I).

Procedimiento.-

0,2 ml de muestra se incuban con 1 ml de reactivo de glucosa oxidasa durante una hora a 37°C. (extinción total). La absorción fué medida a una longitud de onda de 425 nm.

Curva patrón.-

A partir de una solución patrón de glucosa 1 ml - (18,0 mg. de glucosa Analar en 100 ml de agua destilada), - se toman distintos volúmenes y se completan con agua destilada hasta 0,2 ml, siguiendo a continuación el método indicado.

La curva patrón se representa gráficamente llevando en abscisas las distintas concentraciones de glucosa tomadas y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas al leer a la longitud de onda de 425 nm. (Fig. 6).

Paralelamente en cada valoración, se llevan blancos de reactivo y patrón de glucosa en las mismas condiciones que el problema.

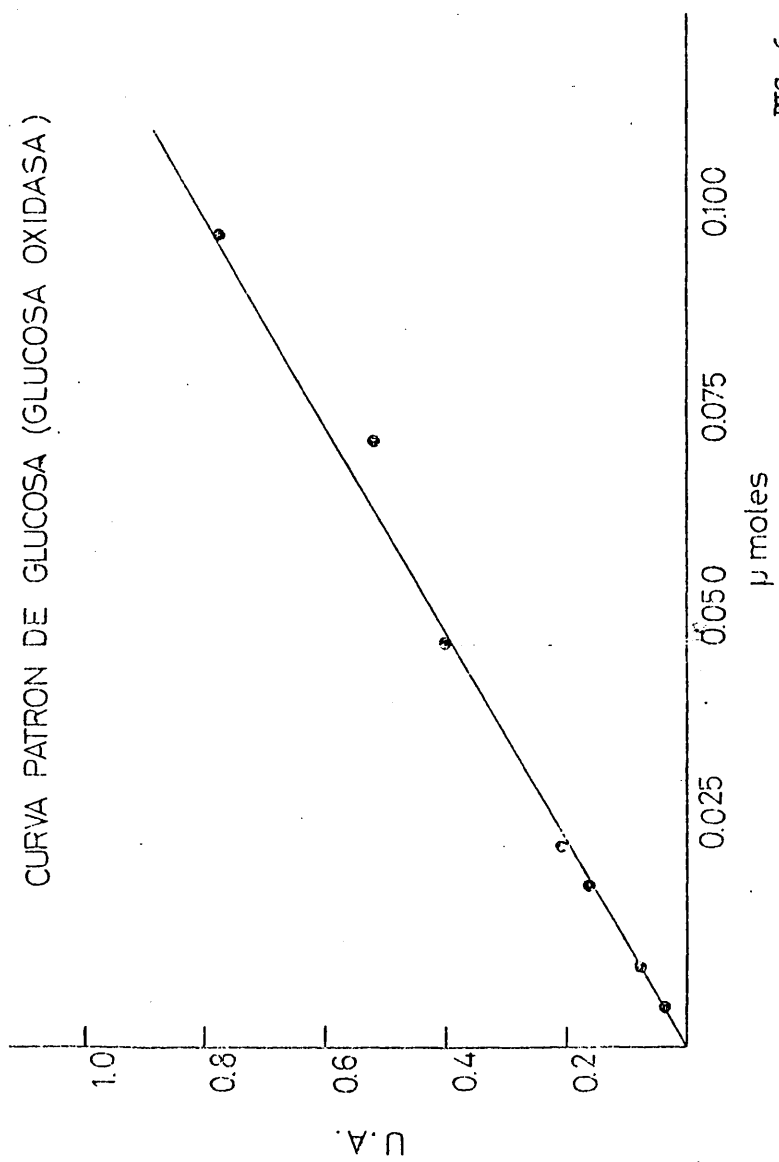


FIG. 6

<u>Volumen (μl)</u>	<u>Concentración (μmoles)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
5	0,005	0,035
10	0,010	0,080
20	0,020	0,160
25	0,025	0,210
50	0,050	0,400
75	0,075	0,580
100	0,100	0,780
200	0,200	2,100

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS.-

Método de Trevelyan y Harrison (1952).

Reactivo de Antrona

A 200 ml de agua destilada se le agregan lentamente y con agitación, 500 ml de SO_4H_2 concentrado. A continuación 0,2 gr. de antrona se disuelven en 100 ml de esta mezcla.

Procedimiento

A 0,6 ml de problema se le añaden 3 ml de reactivo - de antrona, agitar ligeramente y hervir durante 10 minutos, - volver a agitar los tubos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda - de 660 nm. Paralelamente en cada valoración se llevan blancos de reactivo y de problema así como patrones de glucosa, en --

las mismas condiciones que el problema.

Curva patrón.-

A partir de una solución patrón de glucosa 1 mM (18 mg. de glucosa en 100 ml de agua destilada), se toman distintos volúmenes y se completan a 0,6 ml con agua destilada. La curva patrón se representa gráficamente, llevando en abscisas las distintas concentraciones de glucosa expresadas en μ moles y en ordenadas las unidades de absorción .

<u>Volumen (ml)</u>	<u>Concentración (μmoles)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,05	0,05	0,060
0,10	0,10	0,115
0,15	0,15	0,190
0,20	0,20	0,240
0,25	0,25	0,270
0,30	0,30	0,300
0,35	0,35	0,340
0,40	0,40	0,390
0,45	0,45	0,440
0,50	0,50	0,550
0,60	0,60	0,560

CURVA PATRON DE GLUCOSA (ANTRONA)

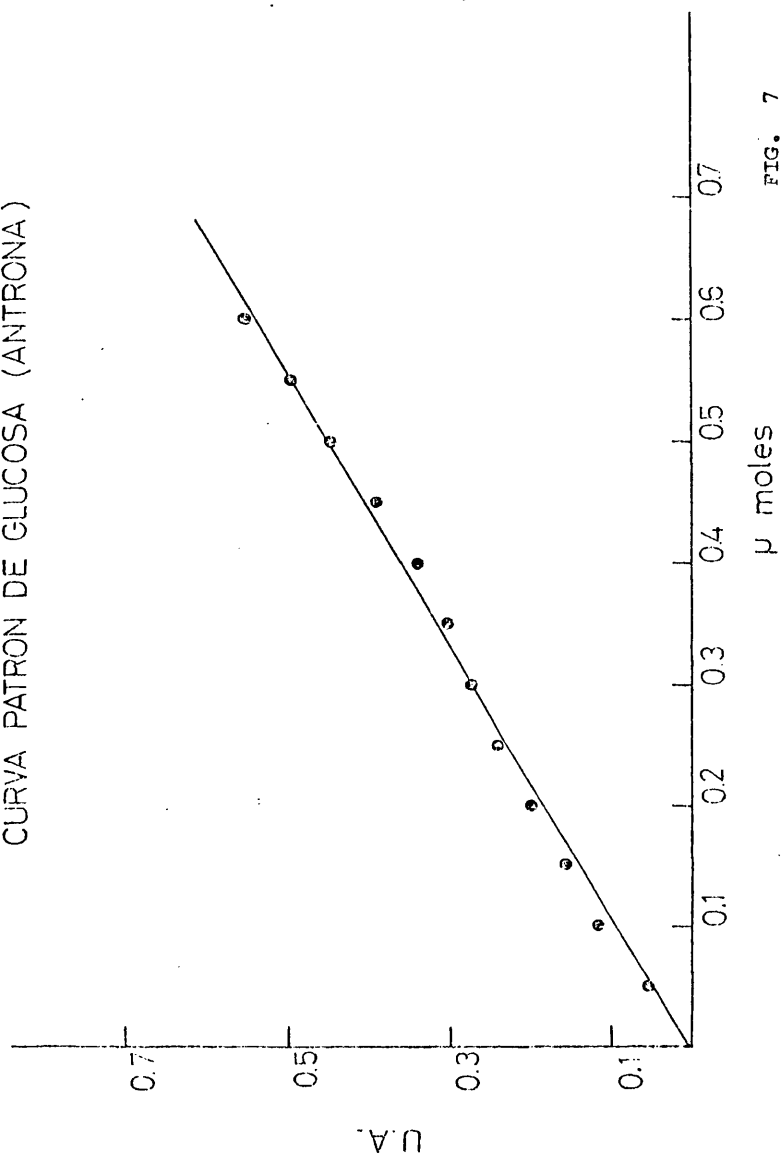


FIG. 7

OBTENCION DE ENZIMAS LITICAS.-

Las diferentes especies de hongos fueron crecidas en cultivos estacionarios a 25°C., en matraces de 100 ml -- de capacidad con 20 ml de medio

los cultivos autolizados se filtraron a través de un disco de papel de filtro (Watman nº1), colocado en el -- fondo de un embudo Buchner, ejerciendo succión mediante vacío. En estos filtrados se precipitaban las proteínas producidas con ácido tánico al 1 % según el método de Shibata y Nisizawa (1965), dejándose a 4°C. durante dos horas. A continuación y sin variar la temperatura el precipitado se separaba por centrifugación a 6000 r.p.m. El sedimento obtenido se lavó 3 veces por centrifugación con 10 ml de acetona Merck a 4°C. y se secó por una corriente de aire filtrado. A continuación se guardó en frasco tapado a 4°C.

VALORACION DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS.-

En estos precipitados se determinaron las actividades enzimáticas existentes por los métodos ya descritos.

1 mg. de precipitado de proteínas se disolvió con agitación en 1 ml de tampón de citrato-fosfato-borato a pH 5,5 50 mM, filtrándose a continuación a través de un filtro Millipore estéril 65 0,22 um, llevándose a cabo en este filtrado los análisis enzimáticos correspondientes. Estos análisis se realizaron periódicamente, para controlar la estabilidad de las enzimas a 4°C.

OBTENCION DE EXTRACTO DE MICELIO.-

Los extractos de micelio de los diferentes hongos estudiados se obtienen a partir de los mismos cultivos autolizados (120 días para Schizophyllum commune y de 70 días para el resto de los hongos), de los que se obtienen las enzimas líticas del líquido de cultivo.

Una vez separado el micelio del líquido de cultivo - por filtración a vacío, se lava varias veces con agua destilada y se pone a congelar a -20°C. El micelio congelado se tritura en un mortero que se coloca sobre una mezcla frigorífica -- (hielo-alcohol-ClNa), durante el tiempo suficiente para que se produzca la desintegración del mismo. Una vez triturado, se extrae con 12 ml de tampón de citrato-fosfato-borato, pH 5,5 , - 50 mM. A continuación se centrifuga a 6000 r.p.m. durante 30 minutos. Se recoge el sobrenadante y se precipita con ácido tánico al 1% por el método de Shibata y Nisizawa (1965).

En el precipitado proteínico obtenido se valoran las actividades enzimáticas existentes, procediendo de igual forma que en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo.

OBTENCION DE PAREDES CELULARES.-

Procedimiento general seguido:

- 1 - Separar el micelio del líquido de cultivo por centrifugación, y lavar varias veces con agua destilada.
- 2 - Congelar el micelio a -20°C . y trituirarlo congelado en un mortero que se coloca sobre una mezcla frigorífica (hielo alcohol- ClNa). Esta operación se realiza el tiempo suficiente para producir la desintegración del micelio.
- 3 - Extraer con tampón de acetato pH 5,5 , 50 mM a 4°C .
- 4 - Centrifugar a 6000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C .
- 5 - Lavar con agua destilada por agitación magnética, durante 2 minutos, centrifugando a continuación durante 15 minutos a 6000 r.p.m.. Esta operación se repite 5 veces, sin variar la temperatura de 4°C .
- 6 - Suspender las hifas en tampón de acetato y romperlas en desintegrador ultrasónico MSE modelo MK₂, 150 w, a 132 micrones, durante un período de 5 a 10 minutos, en intervalos de un minuto de sonicación seguidos de 2 minutos de descanso (refrigeración del vástago). El vaso con el problema se mantiene refrigerado a 4°C .
- 7 - Lavar varias veces en frío como ya se ha dicho, con tampón de acetato, agua destilada, ClNa 0,1 M. y nuevamente con agua destilada, hasta arrastrar todos los restos de ClNa .

- 8- Observar periódicamente al microscopio para comprobar -- cuando las paredes están limpias de todo el contenido citoplasmático.
- 9- Una vez limpias las paredes se lavan con acetona fría -- por centrifugación y se secan con una corriente de aire filtrado. Se conservan a 4°C. en frasco tapado.

DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LAS PAREDES
"IN SITU".

Las paredes se suspenden en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50mM. (1 mg/ml). A esta suspensión se le agrega 1 ml del sustrato correspondiente para la determinación de cada una de las actividades enzimáticas. Después de parar la reacción enzimática como ya se ha descrito, las paredes se separan por centrifugación para llevar a cabo las valoraciones colorimétricas correspondientes.

OBTENCION DE PAREDES CELULARES EN LAS DIFERENTES ESPECIES

Por las características especiales de cada uno de los hongos estudiados, ha sido necesario adaptar el método general de obtención de paredes para cada uno de los casos, como describimos a continuación.

Todos los hongos fueron crecidos en cultivo estacionario a 25°C. en matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio de cultivo de composición ya descrita, inoculados con una suspensión de esporas o de micelio. Las muestras se tomaron en diferentes fases del período de crecimiento.

Penicillium oxalicum.-

Para la obtención de paredes a partir de micelio joven de 2 y 3 días (no autolizado), el micelio congelado se trituró suavemente en el mortero y se terminó de romper en el desintegrador ultrasónico en tampón de acetato durante 20 minutos en intervalos de 1 minuto.

En las muestras procedentes de micelio de 7, 10, y 14 días (después de comenzada la autólisis), no fué necesaria la trituración del micelio congelado debido a que este se presentaba muy deshecho, suspendiéndose directamente en tampón de acetato se rompe por sonicación durante 15 minutos en intervalos de 1 minuto. Muchas de las esporas que presentaba el micelio, fueron eliminadas por centrifugación en lavados sucesivos, pero otras se adherían completamente a las paredes, siendo imposible separarlas aún con la aplicación en gradiente de sacarosa.

Basándonos en el método de Albertsson (1967) de separación de partículas de diferentes propiedades superficiales en dos fases de polímeros, dextrano y polietilenglicol, se intentó separar las esporas de las paredes por la aplicación de este método. Se comprobó que cuando las paredes se lavaban con agitación magnética rápida suspendidas en una de las dos soluciones de Dextrano 500 o Polietilenglicol 6000 al 20% en agua, las esporas se separaban completamente eliminándose posteriormente por centrifugación. De las dos soluciones de polímeros empleadas la de mejor resultados fué la de Dextrano 500 al 20% en solución acuosa, siendo la separación mucho más rápida con la ventaja que este polímero al igual que el Polietilenglicol son biológicamente inertes, no alterándose de esta manera la composición de las paredes.

Después de la agitación magnética de las paredes en la solución de dextrano durante 12 horas, se lavaron muchas veces con agua destilada fría por centrifugación.

A partir del micelio de 14 días se obtuvieron paredes en pequeña cantidad, siendo completamente imposible la obtención de paredes de más días por presentarse el micelio completamente deshecho, lo cual coincide con el alto grado de autólisis alcanzado por este hongo.

Neurospora crassa.-

Para la obtención de paredes de 4 y 5 días (antes del comienzo de la autólisis), el micelio congelado se trituró suavemente en el mortero, sonicándose a continuación suspendido en tampón de acetato durante 15 minutos en períodos -

de un minuto, siendo esta ruptura más intensa en paredes de - 12, 49, y 63 días(micelio autolizado).

Se observó que en todas las muestras el micelio pre sentaba una consistencia pegajosa sobretodo en las de 49 y 63 días, después de lavarlo muchas veces con agua destilada, surgiendo la dificultad de que al romperlo en el desintegrador - ultrasónico, el contenido citoplasmático se pegaba por la par te externa de las paredes. Este problema fué resuelto, suspen diendo el micelio en una solución de dextrano 500 al 20% en - agua destilada lavándolo muchas veces en esta solución por a- gitación magnética rápida y sonicándolo en ella durante 15 mi nutos en intervalos de un minuto. De esta forma el contenido citoplasmático queda **suspendido** en la solución de dextrano y - no adherido al exterior de las paredes. Los restos de dextra- no y de contenido se eliminaron por sucesivos lavados con --- agua destilada a 4°C. por centrifugación.

Aspergillus nidulans.-

Las paredes a partir de micelio joven de 4, 5 y 14 días (antes y después de comenzada la autólisis), se obtuvie- ron siguiendo el método general sin ninguna modificación, no ocurriendo lo mismo para las muestras de 49 y 63 días, en las que el micelio se presentaba bastante deshecho (autolizado) y con esporas adheridas a su pared, procediéndose para su elimi- nación de igual modo que en Penicillium oxalicum. El micelio no se trituró congelado, sonicándose suspendido en el tampón de acetato durante 20 minutos en intervalos de 1 minuto de du

ración. Las esporas adheridas a las paredes se eliminaron por lavados en solución de dextrano 500 al 20% en agua, por agitación magnética rápida durante 12 horas y por sucesivos lavados con agua destilada fría por centrifugación.

Polystictus versicolor.-

Se obtuvieron paredes de 5 y 7 días antes del comienzo de la autólisis, y de 10, 14 y 63 días durante el período autolítico. En todas las muestras se observó la consistencia pegajosa del micelio, siendo imposible la obtención de paredes celulares limpias de contenido con las condiciones -- descritas en el método general, ya que al igual que en Neurospora, al triturar el micelio el contenido citoplasmático se pega al exterior de las paredes uniéndose unas con otras. Este problema fué resuelto como en el caso anterior lavando el micelio en una solución acuosa de dextrano 500 al 20% por agitación magnética durante dos períodos de 12 horas y sonicándolo en esta misma solución durante 5 minutos (micelio joven) y 10 minutos (micelio viejo). Para eliminar los restos de dextrano y de contenido citoplasmático, se hicieron sucesivos lavados con agua destilada fría por centrifugación. Observándose que el contenido celular se adhiere más en las paredes viejas que en las jóvenes.

Aspergillus niger.-

Para la obtención de paredes a partir de las muestras de micelio de 2, 3, 7, 14 y 49 días, se siguió el método

general ya descrito, con la salvedad de que la trituración -- del micelio congelado fúé muy suave en las muestras de 2 y 3 días. El micelio de 63 días se presentaba muy deshecho por lo que no se trituró congelado, sonicándose directamente en tampón de acetato durante 10 minutos en intervalos de 1 minuto.

Las esporas que presentaban las muestras se eliminaron fácilmente por centrifugaciones sucesivas con agua destilada o lavando el micelio varias veces con agua destilada a través de una malla de nylon (trama 1600 mallas por cm^2).

Schizophyllum commune.—

En este hongo se obtienen paredes de 5, 14, 21, 49 y 63 días siguiendo el método general sin modificar.

Mucor mucedo.—

Se obtienen paredes a partir de muestras de micelio joven de 4 y 6 días (no autolizado) y de micelio de 14, 49 y 63 días (autolizado). En todas estas muestras se comprueba -- que al triturar el micelio congelado en el mortero éste se -- deshace completamente, no obteniéndose paredes visibles al microscopio. El procedimiento seguido consiste en lavar varias veces el micelio con agua destilada por agitación magnética y centrifugación, a continuación se rompe en el desintegrador ultrasónico suspendido en una solución de ClNa 0,1 M (mejor resultado que el tampón de acetato) durante 10 minutos para el micelio joven y 20 minutos para el micelio viejo (siempre en períodos de un minuto). Las paredes se lavan muchas veces con

con agua destilada a 49°C. por agitación magnética y centrifugación hasta la total eliminación del ClNa.

Las paredes celulares obtenidas de todas las especies, se observaban muy limpias al microscopio óptico, no obstante para comprobar la carencia de contenido citoplasmático por parte de las paredes, estas se tiñeron con una solución de lactophenol cotton blue.

CALCULO DEL GRADO DE AUTOLISIS

El grado de autólisis alcanzado por cada uno de los hongos a lo largo del período de incubación, se calcula por la pérdida de peso seco que experimenta el micelio a partir del peso máximo alcanzado y se expresa en %.

Para cada hongo junto con los matraces inoculados para la producción de paredes, se ponen otros en las mismas condiciones de cultivo, para calcular el peso seco de cada una de las muestras. El micelio se separa del líquido de cultivo por filtración a vacío y una vez lavado con agua destilada se seca en estufa a 80°C. durante 48 horas dejándolo después en un desecador a vacío durante unas tres horas antes de pesarlo.

DEGRADACION DE PAREDES CELULARES

Método de Hughes (1971), adaptado por Reyes y Byrde (1973).

A suspensiones de paredes de diferentes edades (previamente disgregadas por sonicación durante un minuto) que contienen 1 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato de pH 5,5, 50 mM, se les agrega 1 ml de la solución filtrada de enzimas (1 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5, 50 mM) obtenidas a partir de cultivos autolizados del propio hongo y 0,1 ml de solución de azida sódica 0,02 M (concentración final 0,5 mM). La solución así preparada se pone a incubar en tubos estériles a 37°C durante un período de 120 horas. Junto con los tubos problema se ponen blancos de paredes hervidas y sin hervir a incubar en las mismas condiciones.

El criterio seguido en la medida de la lisis de la pared celular fué el decrecimiento de la densidad óptica (E₆₇₅), a diferentes tiempos de incubación.

Periódicamente los hidrolizados se someten a control microscópico, para detectar cualquier contaminación.

LISIS DE LAS PAREDES CELULARES

Este proceso se llevó a cabo en cada una de las especies estudiadas por el método anteriormente descrito.

Después de 120 horas de incubación los hidrolizados fueron analizados para determinar los azúcares, aminoazúcares y oligosacáridos solubilizados de la pared.

Las determinaciones llevadas a cabo fueran las siguientes:

- Sustancias reductoras

Método de Somogyi y Nelson.

- Glucosa

Método de glucosa oxidasa.

- N-acetilglucosamina

Método de Tracey.

- Polisacáridos totales

Método de la antrona.

PRODUCCION DE PROTOPLASTOS

El método general de obtención de protoplastos se basa en el ataque enzimático del micelio joven del hongo en un medio osmóticamente apropiado.

Siguiendo el método de Reyes y Lahoz (1976), la producción de protoplastos se lleva a cabo por el ataque del micelio con sus propias enzimas líticas producidas en cultivos autolizados de cada hongo.

Preparación del micelio.-

Matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio de cultivo de composición ya descrita, se inoculan con una suspensión de esporas (10^7 /ml) o de micelio (1 ml en cada matraz). Los matraces se ponen a incubar en cultivo estacionario a 25°C o en agitación a 220 r.p.m. a 28°C durante 24 o 48 horas. El micelio crecido en estas condiciones se disgrega suavemente sobre un portaobjetos con unas agujas de acero enmangadas, y se lava en la solución de estabilizador elegido por centrifugación a baja velocidad (1000 r.p.m.) durante 10 minutos. Esta operación se realiza tres veces.

Soluciones estabilizadoras empleadas.-

- Sales inorgánicas: ClK, ClNa, ClNH₄, SO₄Mg.
- Polialcoholes glucídicos: manitol y sorbitol.
- Azúcares: Glucosa, sacarosa y galactosa.

Estas soluciones se preparan en tampón de citrato - fosfato-borato de pH 5,5, 50 mM a concentraciones finales que

oscilan entre 0,2 y 0,9 M. siendo almacenadas a -20°C .

Preparación de la solución de enzimas.-

Las enzimas obtenidas de cultivos autolizados de cada hongo por el procedimiento ya descrito, se disuelven en -- tampón de citrato-forfato-borato pH 5,5 50 mM, a distintas -- concentraciones que van desde 1 a 10 mg/ml. Una vez prepara-- das estas soluciones, se filtran a través de un filtro milipo-- re estéril GS de porosidad 0,22 μm .

Condiciones de cultivo.-

6 ml de la suspensión de micelio en estabilizador -- se ponen a incubar con 2 ml de la solución de enzimas en ma-- trices de 20 ml de capacidad, estériles, en cultivo estaciona-- rio a 35°C o en agitación a 70 r.p.m. a 32°C .

Las muestras se toman cada hora en condiciones esté-- riles y se observan al microscopio. Al medio de incubación se le añaden 0,2 ml de una solución de azida sódica 0,02 M.

RECuento DE PROTOPLASTOS OBTENIDOS

La cantidad de protoplastos obtenidos en cada mues-- tra se calcula por el conteaje de estos a las 24 horas de incu-- bación, en un hematocitómetro Spencer, modelo "Bright-Line A0" (Instrument Company Scientific Instrument Division, Buffalo, N. Y. 14215 U.S.A.). El conteaje se realiza de la manera siguien-- te:

En las ranuras superior e inferior del hematocitó-- metro se deposita una pequeña cantidad de la suspensión de --

protoplastos mediante una pipeta Pasteur, se coloca el cubre-objetos y se procede al conteo en el microscopio.

Al aparato acompaña una tabla cuadrículada en la -- que cada uno de los cuadros tiene escrito un valor numérico -- que corresponderá al número de células expresado en millones por mililitro. Se cuentan hasta un total de 200 células y el valor numérico del cuadro en el que coincida este número (200) nos expresará la concentración de protoplastos. Si el número total de células contadas no alcanza el de 200, el número total de protoplastos contados se multiplica por 10^4 .

PRODUCCION DE PROTOPLASTOS

Condiciones óptimas determinadas para cada uno de los hongos

Penicillium oxalicum.-

Según Peberdy y Buckley (1976).

Preparación del micelio:

El hongo se inocula con 2 ml de suspensión de esporas en matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio de cultivo, en agitación a 220 r.p.m. a 25°C. durante 20 horas. Al cabo de este tiempo el micelio crecido en bolitas muy tenues se disgrega suavemente con agujas enmangadas y se lava 3 veces en ClNH_4 0,8 M. por centrifugación suave (1000 r.p.m.).

Solución estabilizadora:

De todos los estabilizadores probados, el más idóneo fué el ClNH_4 a concentración 0,8 M preparado en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50mM.

◆ Solución de enzimas:

De las concentraciones probadas la de mejor resultados fué a partir de 4 mg/ml.

Condiciones de cultivo:

El micelio se pone a incubar en las condiciones descritas en el método general, en matraces de 25 ml de capacidad, en agitación a 70 r.p.m. a 31°C. durante 24 horas. Las muestras se toman durante las tres primeras horas y luego a --

las 12 y 24 horas.

Neurospora crassa.-

Según Reyes y Lohoz (1977).

Preparación del micelio:

Matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio se inoculan con 2 ml de suspensión de esporas y se incuban -- en cultivo estacionario a 25°C. durante 48 horas. Después de este tiempo el micelio crecido de manera muy tenue, se dis---grega con las agujas y se lava tres veces en una solución de manitol 0,8 M por centrifugación a 1000 r.p.m. durante 10 minutos.

Solución estabilizadora:

De todas las soluciones probadas la más apropiada para este hongo fué la de manitol 0,8 M. en tampón de citrato--fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Solución de enzimas:

La concentración enzimática a partir de la cual se produjo mejor rendimiento fué de 4 mg/ml en tampón de citrato fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Condiciones de cultivo:

6 ml de la suspensión de micelio en estabilizador - con 2 ml de la suspensión de enzima, se ponen a incubar en matraces de 25 ml de capacidad en cultivo estacionario a 35°C. durante 24 horas. Realizando la toma de muestra cada hora, du

rante las tres primeras horas y luego a las 12 y 24 horas.

Aspergillus nidulans.-

Según Peberdy y Gibson (1971,1972) y Musilkova y Fencel (1967)

Preparación del micelio:

Los matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio se inoculan con 2 ml de suspensión de esporas y se ponen a incubar a 25°C. en cultivo estacionario durante 20 horas. - Al cabo de este tiempo el micelio se lava tres veces con una solución de sacarosa 0,9 M. por centrifugación suave.

Solución estabilizadora:

De todas las soluciones probadas la más adecuada en este caso es la de galactosa 0,8 M y $CaCl_2$ al 3% en proporción 4:1, preparada en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Solución enzimática:

De las concentraciones probadas la que da mejor rendimiento es la de 4 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Condiciones de cultivo:

6 ml de la suspensión de micelio en estabilizador - se ponen junto con 2 ml de solución enzimática en matraces de 25 ml de capacidad en agitación a 70 r.p.m. y a 31°C. durante 20 horas. Llevando controles al microscopio durante las tres primeras horas y luego a las 12 y 24 horas.

Polystictus versicolor.-

Según Strunck (1965, 1967, 1970) y De vries y Wessels (1972)

Preparación del micelio:

Matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio se inoculan con 2 ml de suspensión de micelio y se incuban en cultivo estacionario a 25°C. durante 48 horas. El micelio así crecido se lava tres veces con una solución de SO_4Mg 0,8 M.

Solución estabilizadora:

De todos los estabilizadores probados el más adecuado resultó ser SO_4Mg 0,8 M. en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 0,05 N.

Solución enzimática:

La solución de concentración más apropiada resultó ser la de 4 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Condiciones de cultivo:

6 ml de la suspensión de micelio en estabilizador y 2 ml de la solución enzimática se ponen a incubarse en matraces de 25 ml de capacidad en cultivo estacionario a 30°C, durante 24 horas.

Aspergillus niger.-

Según Musilkova y Fencel (1967)

Condiciones de cultivo:

Matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio

se inoculan con 2 ml de suspensión de esporas y se incuban en agitación a 220 r.p.m. y a 28°C durante 20 horas. El micelio en estas condiciones crece en pequeñas bolitas las cuales se disgregan con las agujas de acero enmangadas de manera suave y se lavan tres veces con una solución de sacarosa 0,9 M. por centrifugación suave.

Solución estabilizadora:

De todas las probadas, la solución más apropiada fué la de galactosa 0,8 M y Cl_2Ca al 3% en proporción de 4:1. Según los autores anteriormente citados, el lavar el micelio -- con sacarosa junto con la presencia de Cl_2Ca en la solución -- estabilizadora, ayuda a aumentar la producción de protoplas-- tos y la integridad de los mismos.

Solución enzimática:

La concentración enzimática a partir de la cual se -- produce un buen rendimiento en la producción de protoplastos, es la de 4 mg/ml, preparándose una solución con esta concen-- tración en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Condiciones de cultivo:

En matraces de 20 ml de capacidad se ponen a incubar 6 ml de la suspensión de micelio en estabilizador junto con -- 2 ml de solución enzimática a 31°C. en agitación a 70 r.p.m. durante 24 horas.

Schizophilum commune.-

Según De vries y Messels (1972)

Preparación del micelio:

Con 2 ml de una suspensión de micelio se incuban matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio de cultivo, en cultivo estacionario a 25°C. durante 48 horas. El micelio crecido en estas condiciones se disgrega suavemente con las agujas y se lava tres veces con ClNH_4 0,8 M.

Solución estabilizadora:

De todas las soluciones probadas la que dió mejores resultados fué la de ClNH_4 0,8 M. en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Solución enzimática:

Los mejores resultados se obtuvieron a partir de -- concentraciones de 6 mg/ml, preparando una solución de esa -- concentración en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 -- mM.

Condiciones de cultivo:

6 ml de la suspensión de micelio en estabilizador -- se ponen a incubar junto con 2 ml de la solución enzimática -- en agitación a 70 r.p.m. y 31°C durante 24 horas.

Mucor mucedo.-

Según Ramirez-León y Ruiz-Herrera (1972)

Preparación del micelio:

2 ml de suspensión de esporas se inoculan en matraces de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio y se incuban a

25°C. en cultivo estacionario durante 48 horas. Al cabo de este tiempo el micelio crecido, se lava tres veces por centrifugación suave en una solución de ClNa 0,8 M.

Solución estabilizadora:

De todas las soluciones probadas la que da mejor resultado es la de ClNa 0,8 M en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Solución enzimática:

La solución más adecuada fué la que contenía 4 mg/ml en tampón de citrato-fosfato-borato pH 5,5 50 mM.

Condiciones de cultivo:

Se incubó en agitación a 70 r.p.m. y a 31°C en las mismas condiciones descritas que en el caso anterior, durante 24 horas.

RECUESTO DE PROTOPLASTOS.-

La cuantificación se llevó a cabo en un hematocitómetro por el método anteriormente descrito. Debido a la movilidad y fragilidad de los protoplastos, el conteo se repitió 8 veces calculándose un valor medio de protoplastos producidos por 21 mg de peso seco de micelio por matraz, ~~con~~ 2,6 mg de peso seco por ml de medio.

TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA PARA PAREDES CELULARES

Técnica de sombreado con Au/Pd.-

Mediante la aplicación de esta técnica, se observa al microscopio electrónico la morfología externa de paredes - jóvenes antes y después de ser sometidas a la lisis enzimática. Las paredes son lavadas tres veces con agua destilada por centrifugación a 4000 r.p.m.

Las paredes lavadas se colocan sobre rejillas con - película de formvar reforzada con carbono, para lo cual estas rejillas se preparan sobre papel de filtro previamente humedecido. Para aplicar la muestra sobre la rejilla se pone sobre esta una gota de la suspensión de paredes con una pipeta Pasteur, con cuidado de no dañar la rejilla. La rejilla con la - muestra se coloca en una placa petri y se seca en estufa a -- 37°C. Una vez secas las preparaciones se observan al microscopio óptico para comprobar la colocación de la muestra. A continuación las paredes se somborean con Au/Pd en un vaporizador Siemens.

Preparación de cortes ultrafinos.-

- 1 - El material que se va a cortar se lava tres veces con --- agua destilada, por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 minutos.
- 2 - Fijación de la muestra contenida en el tubo de ensayo con

solución acuosa de MnO_4K al 2%. La muestra se cubre con esta solución y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente.

3- Deshidratación de la muestra con acetona, a temperatura ambiente de la siguiente manera:

- a) Tratamiento con acetona al 30% durante 15 minutos.
- b) " " acetona al 50% " 30 "
- c) " " acetona al 70% " 30 "
- d) " " acetona al 70% más una solución de contraste de acetato de uranilo $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{UO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a una concentración final del 2%, durante 12 o más horas.
- e) Tratamiento con acetona al 90% durante 30 minutos.
- f) " " acetona al 100% " 30 minutos.
- g) " " acetona más SO_4Cu (cristales) durante 30 minutos.
- h) Tratamiento con acetona y SO_4Cu durante 30 minutos.

4- Inclusión de la muestra en Araldita o "Durcupal".

- a) Tratar la muestra con óxido de propileno durante una hora (el óxido de propileno hace de puente entre la resina epoxi "araldita" y la acetona).
- b) Tratar con óxido de propileno 1 hora.
- c) " con óxido de propileno y Araldita I en proporción 3:1 durante dos horas.
- d) Tratar con óxido de propileno y Araldita I en proporción de 2:2 durante una horas.
- e) Tratar con óxido de propileno y Araldita en proporción de 2:2 durante una hora

- f) Tratar la muestra con Óxido de propileno y Araldita I - en proporción de 1:3 durante dos horas.
- g) Tratar con Araldita I durante 12 a 24 horas en estufa - a 50°C.
- h) Tratar nuevamente con Araldita I de 12 a 24 horas en estufa a 50°C.
- i) Tratar con Araldita II durante una hora a 50°C.
- j) " " " " " 30 minutos a 50°C. Este paso se realiza dentro de la cápsula de silicona.

Una vez finalizada la inclusión de la muestra, los cortes se realizan en un ultramicrotomo L.K.B. con cuchilla - de vidrio.

Tinción de cortes ultrafinos.-

Según la técnica de Reynolds, E.S. (1963).

La tinción de los cortes se realiza con citrato de plomo.

Reactivos :

- | | |
|--|----------|
| - Nitrato de plomo (NO_3) ₂ Pb ----- | 1,33 gr. |
| - Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)Na.2H ₂ O ---- | 1,76 gr. |
| ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)Na.5,5H ₂ O --- | 2,14 gr. |
| - Agua destilada ----- | 30 ml |

Procedimiento

Una vez mezclados los reactivos se agita fuertemente la mezcla durante 1 minuto y con intervalos, hasta un tiempo de 30 minutos, para que ocurra la conversión total del ni-

trato en citrato de plomo. A la mezcla así preparada se le añade 8 ml de NaOH 1N y se diluye hasta 50 ml con agua destilada, mezclando bien por simple inversión. En el caso que la mezcla presente turbidez, ésta se elimina por centrifugación. Esta solución se conserva en frascos de polietileno durante seis meses.

Los cortes se tiñen en esta solución durante un tiempo que depende del tipo de inclusión utilizada. Para inclusiones con resinas epoxi, como es la araldita este tiempo oscila entre 15 y 30 minutos. Transcurrido este tiempo los cortes se lavan varias veces con agua destilada.

En Penicillium oxalicum, se realizaron cortes ultra finos en sus paredes celulares de 3 días, antes y después del ataque enzimático, y en micelio joven (3 días) y viejo (14 días). En todos los casos estudiados los cortes se hicieron de preparaciones en fresco, para lo cual las paredes no se secaron con acetona, sino que después de su obtención se fijaron directamente con permanganato. Debido a la poca consistencia presentada por las paredes y el micelio, ambos se incluyeron en agar previamente a la deshidratación.

PROCEDENCIA DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS

Los reactivos empleados en todos estos experimentos - fueron de pureza analítica, procediendo de las firmas siguientes:

Probus, S.A., Badalona (España); E. Merck, Darmstadt (Alemania); Serva, Heidelberg (Alemania); Difco, Detroit (U.S.A.); Riedel, De Haën AG - Seelze Hannover (Alemania); May and Baker LTD., Dagenham (Inglaterra); Fluka A G Busch SG (Suiza); Sigma, St. Louis M.O. (U.S.A.); Koch-Light Laboratories Ltd. -- Colnbrook, Bucks (Inglaterra); BDH, Poole (Inglaterra).

R E S U L T A D O S

Penicillium oxalicumGrado de autólisis.-

A las 48 horas de incubación en las condiciones ya descritas se observa un abundante crecimiento del micelio alcanzando el peso máximo a las 72 horas (103,6 mg. de peso seco/muestra). En la figura VIII, se encuentran representados los valores de los distintos grados de autólisis alcanzados por el hongo, con el tiempo de incubación (expresado en días). En esta figura podemos observar un aumento progresivo del grado de autólisis a lo largo de este período, que va desde un 19,8 % para el día sexto de crecimiento (tercero de autólisis) hasta un 96 % en el día 63 de incubación.

Variación del pH en la autólisis.-

En la siguiente tabla se han agrupado los valores de pH en los distintos días del período de incubación.

<u>Días</u>	<u>pH</u>
2	3,4
3	4,0
6	9,0
14	8,2
49	6,3
63	6,0

Estos datos demuestran que la fase de autólisis en

en este hongo transcurre a pH básico.

Valoración de enzimas líticas.-

Las enzimas líticas valoradas fueron:

- Quitinasa.
- β -N-acetilglucosaminidasa.
- Fosfatasa ácida.
- Fosfatasa alcalina.
- β -1-3 glucanasa.
- Invertasa.
- Celulasa.
- Dextranasa.
- Poligalacturonidasa.
- β -1-4 glucanasa.
- β -1-6 glucanasa.
- Amilasa.

Los resultados obtenidos para estas valoraciones enzimáticas, realizadas en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo y del extracto de micelio, así como los correspondientes a las actividades enzimáticas retenidas por las paredes de 3 días, se encuentran representados, en la tabla III. La cantidad de proteínas obtenidas en los precipitados del líquido de cultivo y extracto de micelio fué respectivamente, 10,3 y 0,95 mg. de proteína/muestra.

Paredes celulares.-

Las paredes celulares obtenidas fueron de edades --

comprendidas entre 2 y 14 días. La obtención de paredes de más edad fué totalmente imposible, ya que a partir del día 14 el micelio aparece bastante deshecho, coincidiendo este hecho - con el alto grado de autólisis, alcanzado por este hongo.

Grado de lisis de las paredes celulares con el tiempo de incubación.-

Los grados de lisis alcanzados por paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación, se encuentran agrupados en la tabla I. Los blancos de las paredes hervidas y sin hervir, no presentan ninguna alteración a lo largo de las 120 horas de incubación.

La lisis progresiva de las paredes jóvenes (2 días) y viejas (14 días), con el tiempo de incubación (horas), se encuentra representada en la figura IX.

En la figura X, se han representado los grados de lisis alcanzados (eje de ordenadas) a las 120 horas de incubación, por las paredes de diferentes edades (eje de abscisas).

Valoraciones realizadas en los hidrolizados de las paredes -- después de 120 horas de lisis.-

Las valoraciones llevadas a cabo en estos hidrolizados fueron:

- N-acetilglucosamina.
- Glucosa.
- Sustancias reductoras.

- Carbohidratos totales.

Los resultados obtenidos de estas valoraciones se encuentran agrupados en la tabla II.

Microscopía óptica.-

El aspecto morfológico que presentan las paredes celulares al ser observadas al microscopio óptico, después de su obtención, puede verse en las figuras 1 y 2 (paredes jóvenes de 2 días), y en las figuras 3 y 4 (Paredes de 14 días). En todas las fotografías las paredes se observan limpias de contenido citoplasmático.

Microscopía electrónica.-

La estructura microfibrilar de las paredes jóvenes de 2 días, fué observada al microscopio electrónico en preparaciones de paredes sombreadas con Au/Pd, como puede verse en las fotografías 1 y 3. Las fotografías 2 y 4 muestran estas mismas paredes a las 20 horas de lisis producida por sus propias enzimas, pudiendo observarse en ellas el cambio estructural producido por el ataque enzimático en dichas paredes, apareciendo en ellas numerosos puntos de ataque en forma de oquedades o agujeros.

Cortes ultrafinos de estas mismas paredes (teñidos con citrato de plomo) pueden observarse en las fotografías 5, 7 y 8, correspondientes a paredes sin atacar enzimáticamente y en las que puede verse como la pared está formada por un

conjunto de capas de densidad electrónica diferente. En las fotografías 6, 9, 10, 11 y 12, puede observarse el cambio estructural sufrido por las paredes después de 20 horas de ataque enzimático; este ataque no ocurre de manera uniforme, --- siendo más intenso en unas zonas que en otras (Fotos 11 y 12).

En los cortes finos de micelio de 3 días (sin autolizar) de 14 días (autolizado), podemos observar, que durante el proceso autolítico ocurre una lisis natural, no solo del citoplasma sino también de la pared celular. En las fotografías de micelio joven (fotos 13, 15, 17 y 19), puede verse -- claramente la estructura del citoplasma y de la pared celular, siendo esta estructura de la pared celular, comparable a la observada en cortes ultrafinos de paredes de 3 días (fotos 5, 7 y 8). Análogamente, los micelios autolizados de 14 días presentan una desorganización tanto del contenido citoplasmático, como de la pared celular, siendo esta alteración de la pared comparable (fotos 14, 16, 18 y 20) a la observada en cortes ultrafinos de paredes de 3 días después de 20 horas de ataque enzimático (fotos 6, 9, 10, 11 y 12).

Protoplastos.-

En las condiciones ya descritas los protoplastos de este hongo, se obtuvieron con bastante facilidad, empezando a salir a partir de la primera hora de incubación y obteniéndose el máximo rendimiento, a las 24 horas. Al cabo de este --- tiempo, las hifas se observaban vacías de contenido citoplas-

mático y con roturas en su parte apical.

La morfología de los protoplastos formados, puede - observarse en el conjunto fotográfico formado por las figuras de la 1 a la 8. Como puede verse algunos de estos protoplas--tos, presentan mayor contenido citoplasmático (fig. 6 y 7), - mientras que otros se observan vacíos de contenido (fig. 4 y 5).

La autenticidad de los protoplastos formados se comprobó por choque osmótico en agua destilada, observándose a - continuación muchos trozos de contenido citoplasmático disgre--gados en el medio y ningún protoplasto. Otra prueba de su au--tentidad, fueron los fenómenos de fusión que frecuentemente se observaba entre ellos (fig. 4).

A las 24 horas de incubación la cantidad de proto--plastos obtenida por mg. de peso seco de micelio fué de $1,3 \cdot 10^5$.

Lisis de paredes jóvenes de las diferentes especies de hongos estudiadas, con las enzimas líticas de *Penicillium oxalicum*.

Dada la fuerte actividad lítica presentada por las enzimas de *Penicillium oxalicum*, se probó el efecto que producían dichas enzimas sobre las demás paredes jóvenes de los hongos estudiados. En la mayoría de los casos, se observó que los grados de lisis alcanzados por las distintas paredes, eran más elevados que los que experimentaban dichas paredes, al ser atacadas con sus propias enzimas líticas.

En la tabla siguiente se encuentran agrupados los grados de lisis (%) alcanzados por las paredes jóvenes, con el tiempo de incubación.

<u>PAREDES</u>								
<u>Hongos</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
<u>N. crassa</u> (4 días)	39.1	43.8	54.3	63.0	87.0	87.6	87.6	87.6
<u>A. nidulans</u> (3 días)	16.4	19.7	49.2	50.8	50.8	62.3	62.3	62.3
<u>A. niger</u> (3 días)	0.0	19.3	29.8	59.7	59.7	68.5	71.9	71.9
<u>S. commune</u> (7 días)	0.0	0.0	0.0	6.5	6.5	6.5	9.1	9.1
<u>M. mucedo</u> (4 días)	29.6	36.4	38.7	40.1	43.2	43.2	45.5	45.5

TABLA I - Penicillium oxalicum

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación en la solución enzimática.

<u>PAREDES</u>	<u>HORAS</u>						
	<u>1</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
2	24.2	24.5	78.8	83.4	87.9	90.0	95.5
3	39.5	42.2	79.0	82.9	85.5	85.5	85.5
7	34.3	34.3	77.2	81.4	85.7	85.2	85.2
10	20.5	20.5	33.4	41.0	48.0	48.0	48.0
14	15.0	17.5	37.5	50.0	50.0	50.0	50.0

TABLA II - Penicillium oxalicum.

Carbohidratos totales, sustancias reductoras, glucosa y N-acetilglucosamina, procedentes de -- las paredes celulares después de 120 horas de hidrólisis.

<u>PAREDES</u>	<u>Microgramos/miligramo de paredes</u>			
	<u>Carb.T.</u>	<u>Subt.red.</u>	<u>Glucosa</u>	<u>N-acet.</u>
2	800.0	212.4	83.3	63.9
3	750.0	186.3	115.9	82.7
7	--	180.6	99.0	65.9
10	--	54.6	30.4	20.8
14	450.0	79.7	50.6	22.5

TABLA III - Enzimas líticas de Penicillium oxalicum

- a) Actividades encontradas por muestra en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- b) Actividad específica en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- c) Actividades retenidas por miligramo de paredes jóvenes (3 días).

ENZIMAS	a		b		c
	mU/muestra		mU/mg proteínas		mU/mg pared
	L.C.	Ext.M.	L.C.	Ext.M.	
Quitinasa	11.60	4.33	1.10	4.58	0.00
β -N-acet.	616.00	94.60	59.80	100.00	1.60
Fosf. Acid.	0.00	8.80	0.00	9.30	1.80
Fosf. Alc.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
β -1-3 gluc.	9466.00	255.20	919.00	269.70	1.68
Invertasa	3566.00	88.00	346.20	93.00	8.20
Celulasa	352.00	0.00	34.20	0.00	5.20
Dextranasa	80.00	0.00	7.80	0.00	16.00
Poligalact.	792.00	123.20	76.90	130.30	45.00
β -1-4 gluc.	1506.00	105.60	146.20	111.60	0.00
β -1-6 gluc.	0.00	10.56	0.00	11.20	0.00
Aamilasa	1266.00	0.00	122.90	0.00	12.60

Los resultados fueron la media de tres experimentos

Penicillium oxalicum

grado de autólisis (%)

88

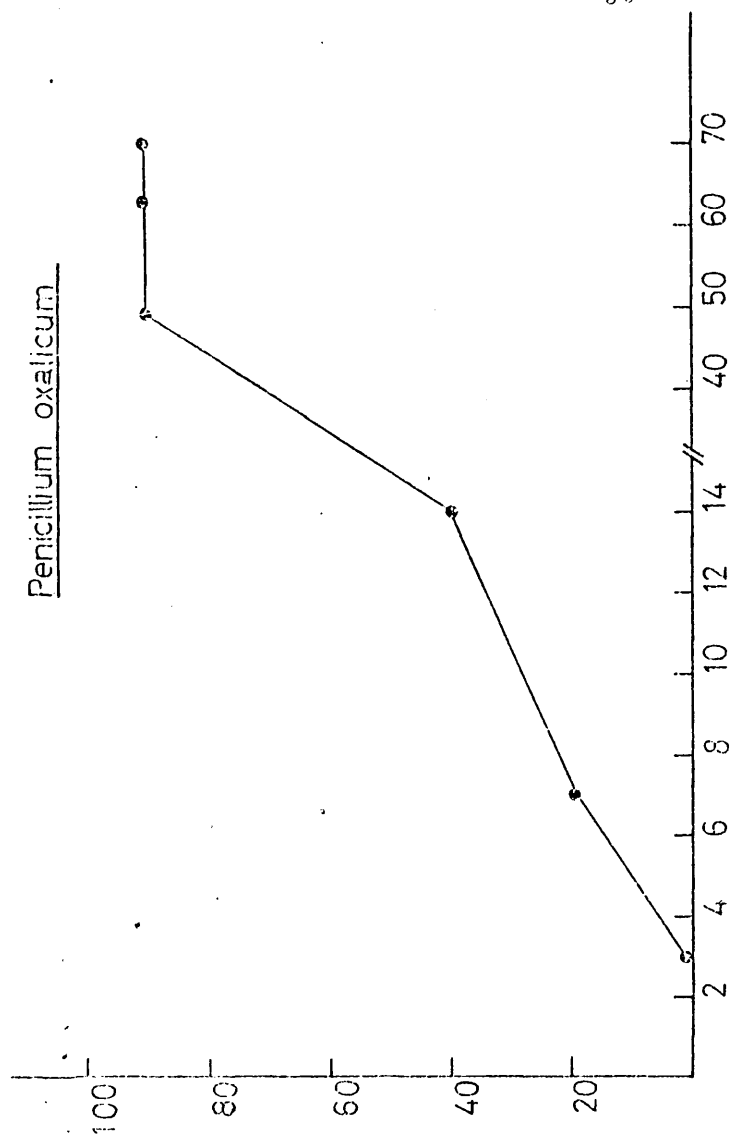


FIG. VIII

periodo de incubación (días)

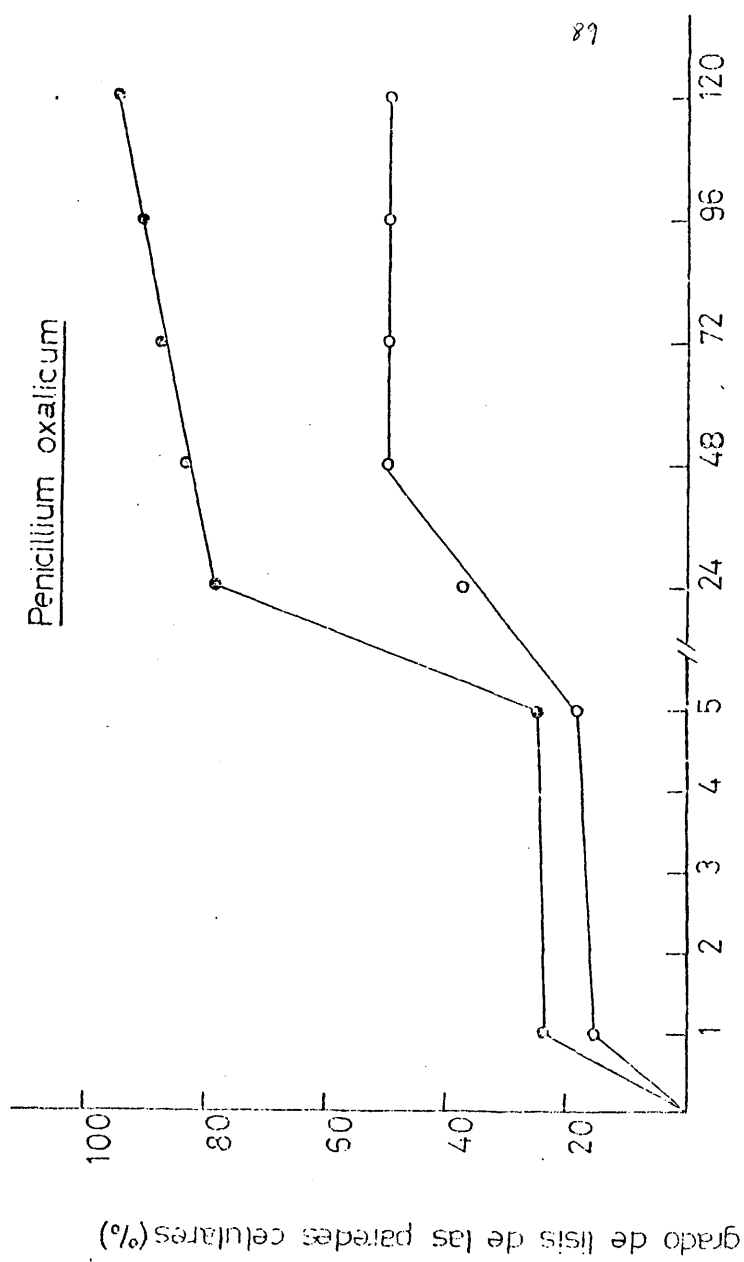


FIG. IX
tiempo de incubación (horas)

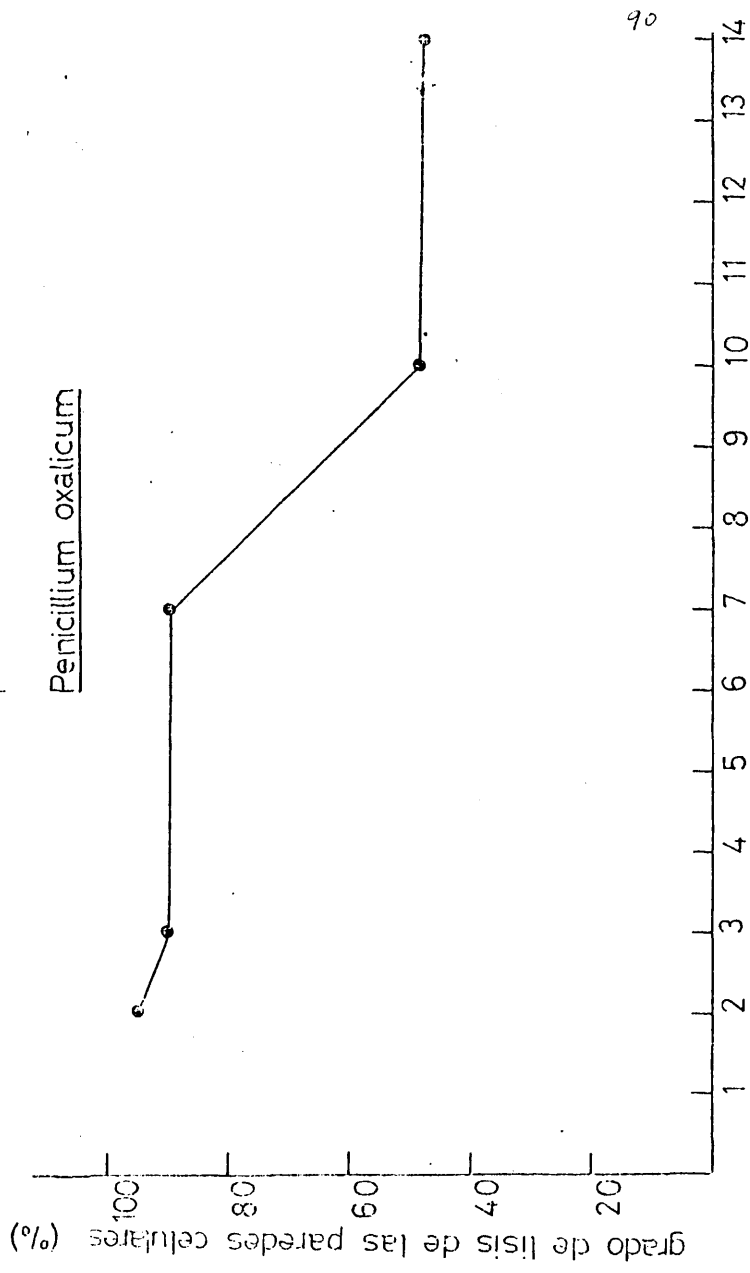


FIG. X.
paredes de diferentes edades (dias)

Penicillium oxalicum

91

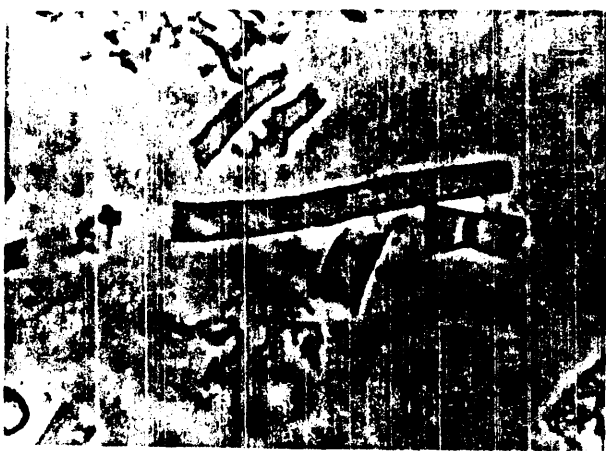


Fig.1



Fig.2

Penicillium oxalicum

92



Fig.3

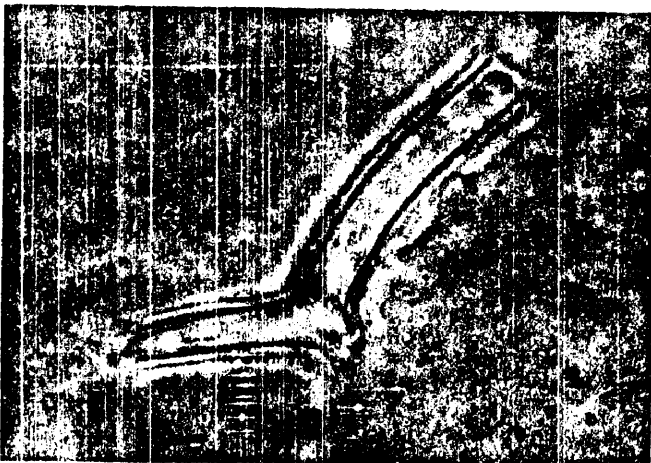
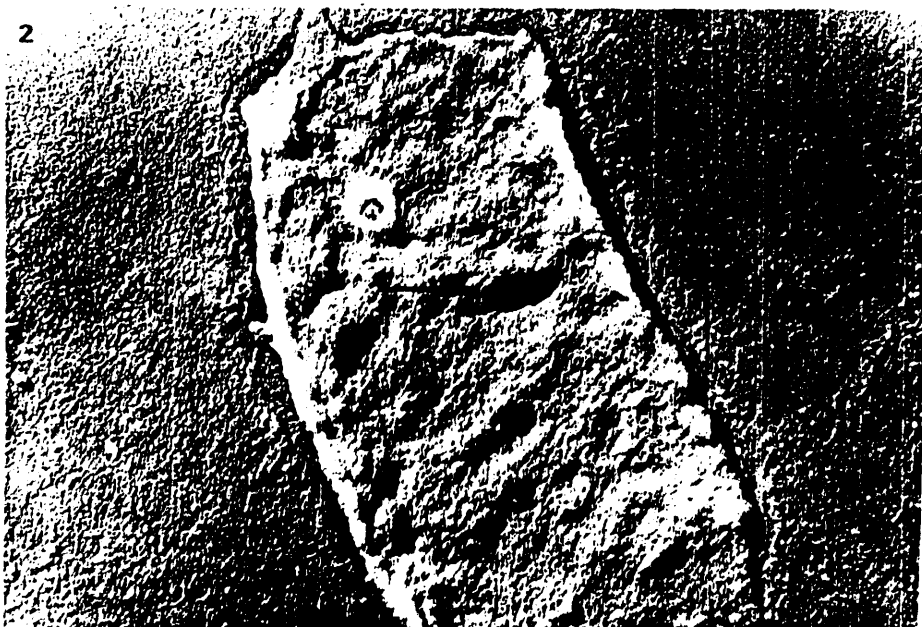
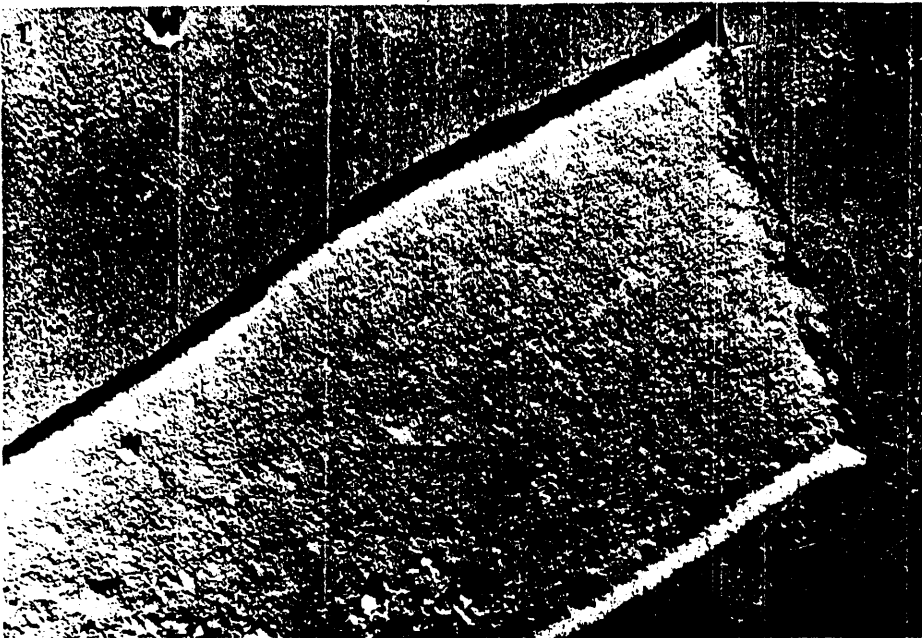


Fig.4

Penicillium oxalicum

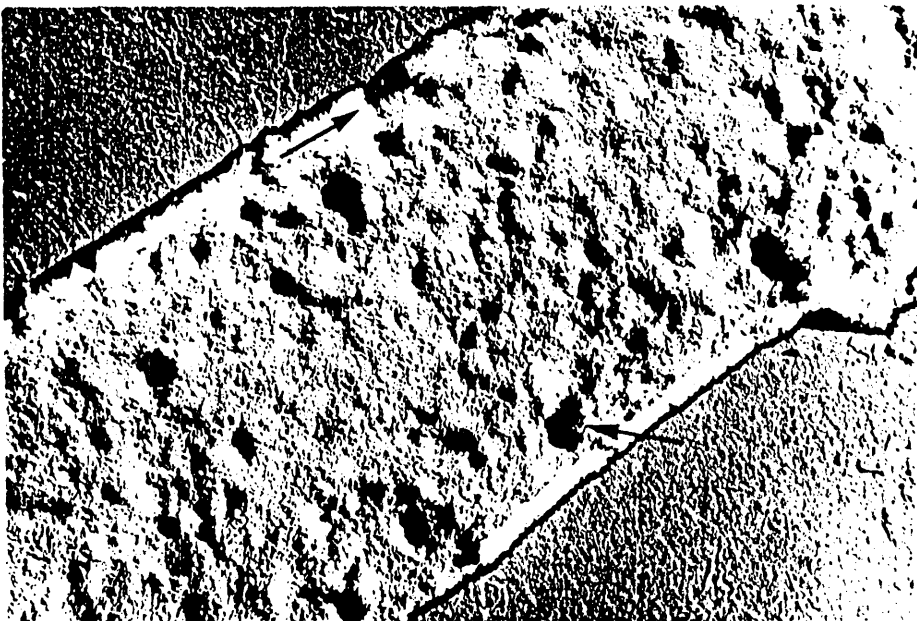
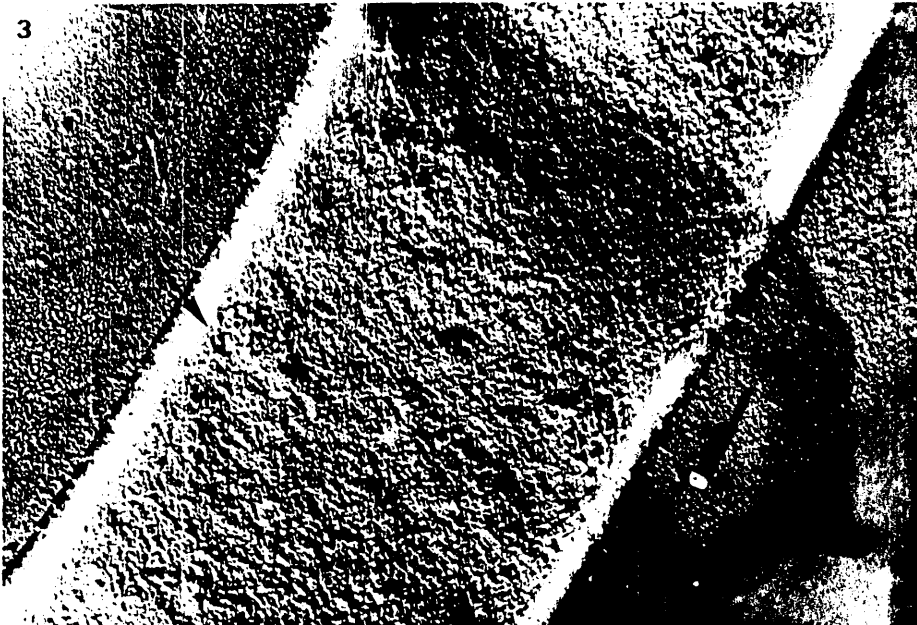
93



Penicillium oxalicum

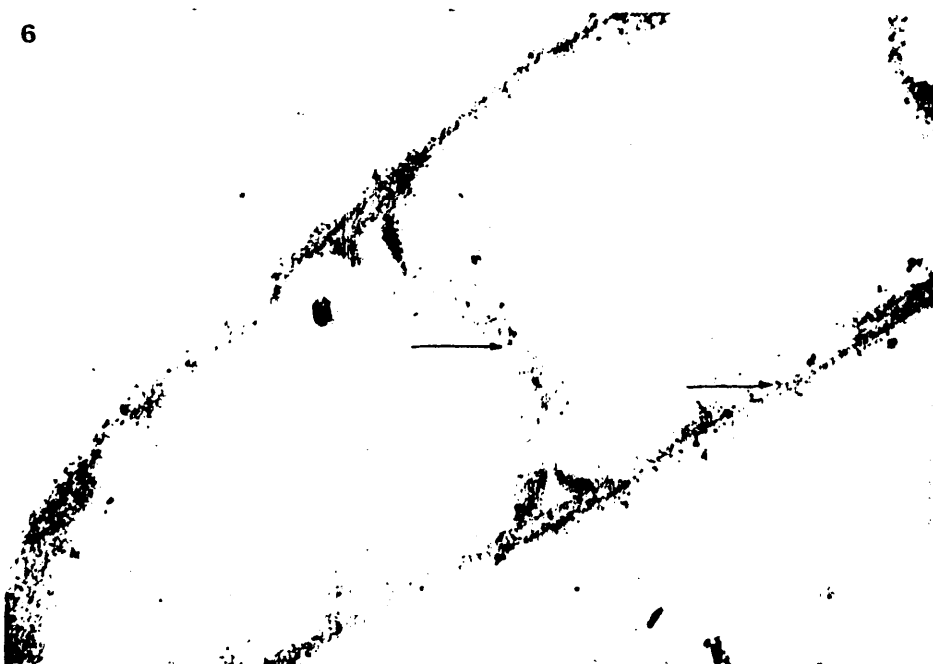
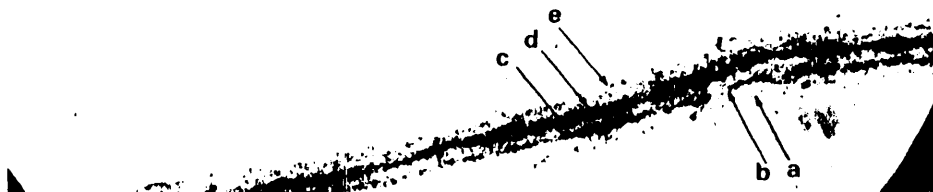
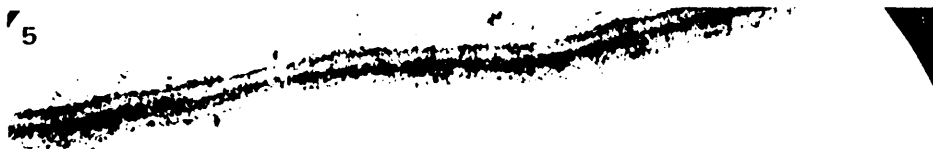
2/1

3



Penicillium oxalicum

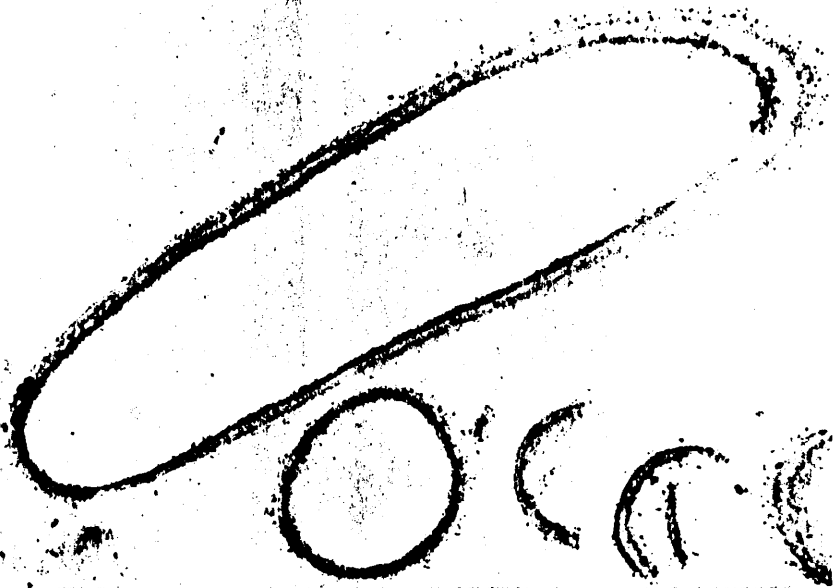
95



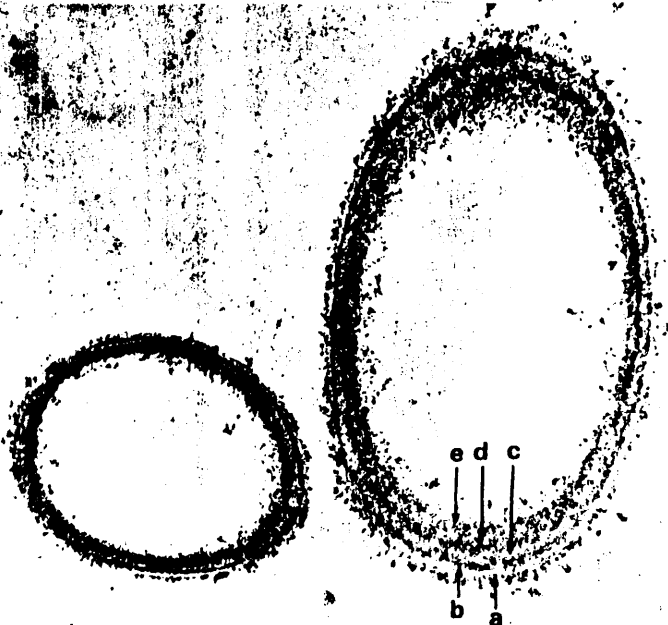
Penicillium oxalicum

96

7



8



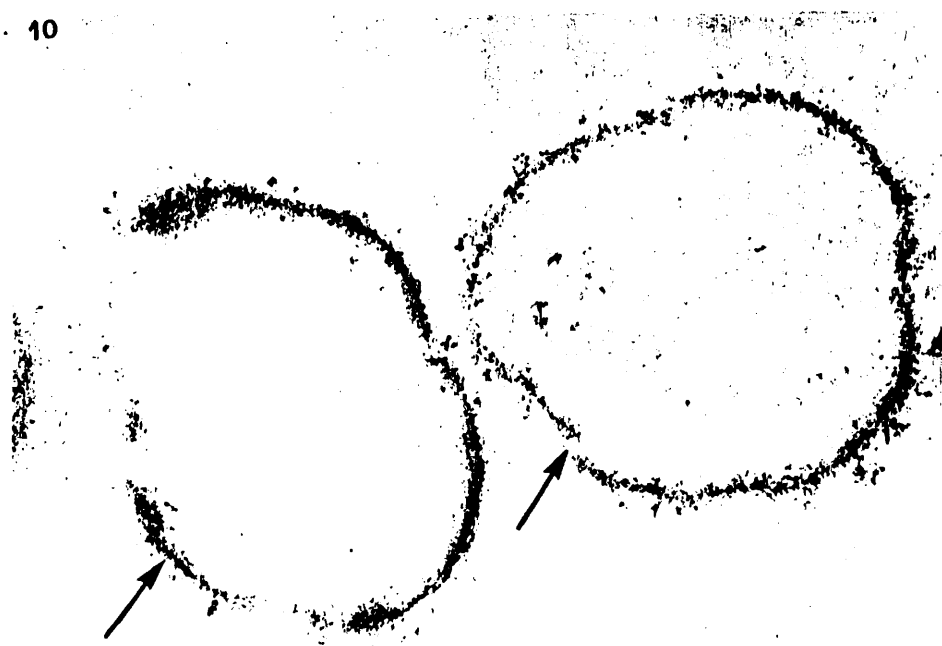
Penicillium oxalicum

77

9

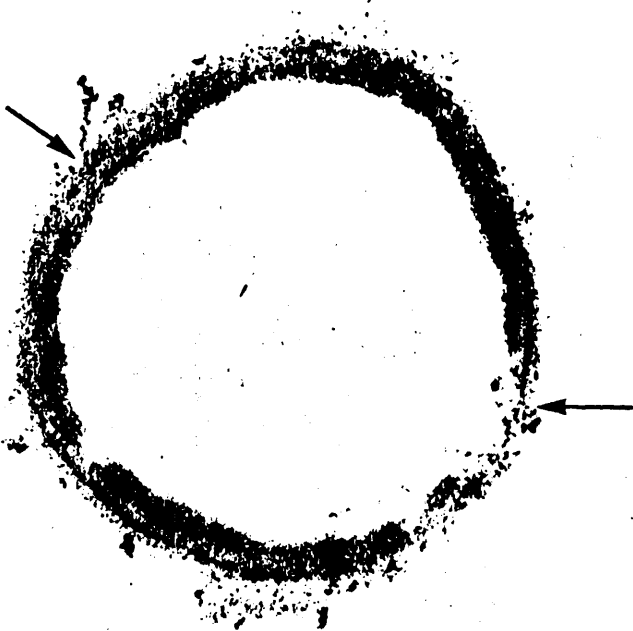


10

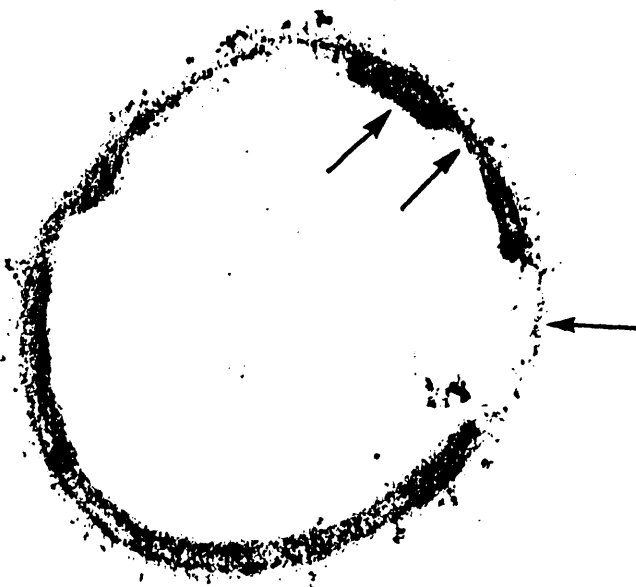


Penicillium oxalicum 98

11



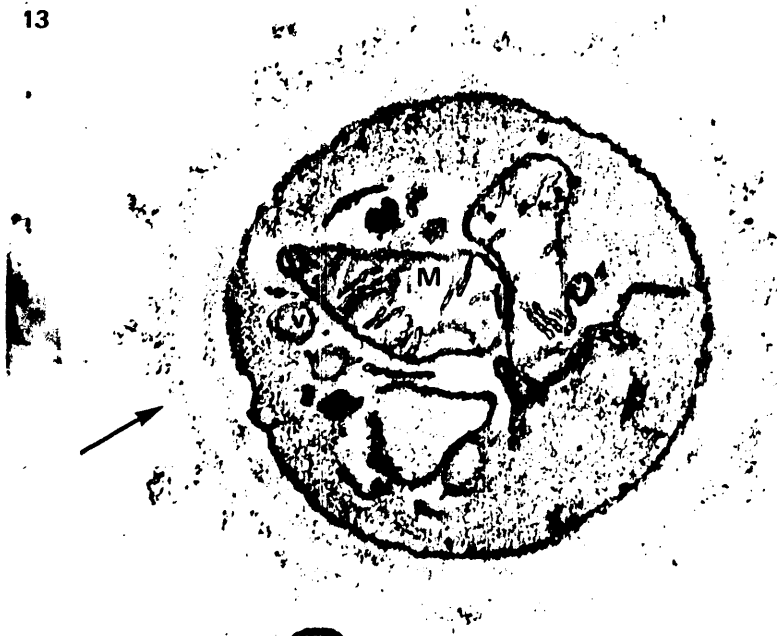
12



Penicillium oxalicum

99

13



14



Penicillium oxalicum

100



Penicillium oxalicum

101

17



18



Penicillium oxalicum 102

19



20



Penicillium oxalicum 103

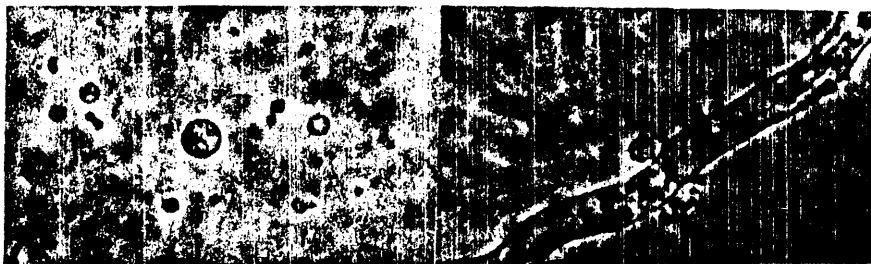


Fig.1

Fig.2

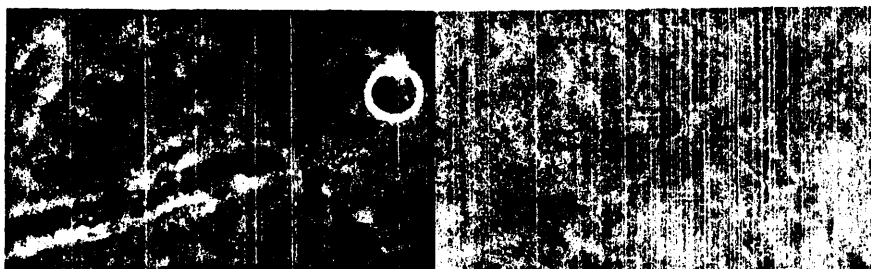


Fig.3

Fig.4

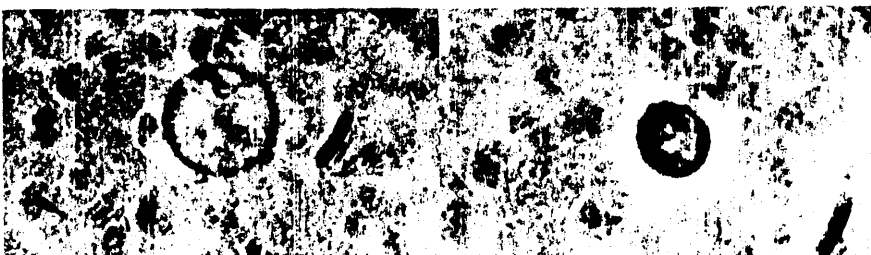


Fig.5

Fig.6



Fig.7

Fig.8

Penicillium oxalicum.-

Fig.1 y Fig.2 : Paredes de 3 días (microscopio óptico x1000)

Fig.3 y Fig.4 : Paredes de 14 días (microscopio óptico x1000)

Foto 1 : Paredes de 3 días (sombreado Au/Pd) x 30.000

Foto 2 : Paredes de 3 días después de 20 horas de ataque enzimático.(Au/Pd) x 27.600

Foto 3 : Paredes de 3 días (Au/Pd) x 46.000

Foto 4 : Paredes de 3 días después de 20 horas de ataque enzimático (Au/Pd) x 34.500

Foto 5 : Corte ultrafino de paredes de 3 días (citrato de Pb).
x 56.700.

Foto 6 : Corte ultrafino de paredes de 3 días después de 20 horas de ataque enzimático (citrato de Pb) x 48.000

Foto 7 : Corte ultrafino de paredes de 3 días (citrato de Pb) -
x 18.200

Foto 8 : Cortes ultrafinos de paredes de 3 días (citrato de Pb)
x 31.200

Foto 9 y 10 : Cortes ultrafinos de paredes de 3 días después de
20 horas de ataque enzimático (citrato de Pb). -
x 48.000

Fotos 10 y 11 : Cortes ultrafinos de paredes de 3 días después -
de 20 horas de ataque enzimático (citrato de Pb)
x 46.000

103/ai

Foto 13 : Corte ultrafino de micelio de 3 días (citrato de Pb)
x 38.400

Foto 14 : Cortes ultrafinos de micelio de 14 días (autolizado)
(citrato de Pb) x 40.000

Foto 15 : Cortes ultrafinos de micelio de 3 días (sin autolizar)
(citrato de Pb) x 20.000

Foto 16 : Cortes ultrafinos de micelio de 14 días (citrato de -
Pb) x 26.000

Foto 17 : Cortes ultrafinos de micelio de 3 días (Citrato de Pb)
x 37.200

Foto 18 : Cortes ultrafinos de micelio de 14 días (citrato de -
(citrato de Pb) x 26.000

Foto 19 : Cortes ultrafinos de micelio de 3 días (citrato de Pb)
x 27.700

Foto 20 : Cortes de micelio de 14 días (citrato de Pb) x 26.000

Figuras de la 1 a la 8 : Aspecto morfológico que presentan los
protoplastos de este hongo al microscopio óptico (x1000). (ClNH₄ 0,8 M.)

Neurospora crassaGrado de autólisis.-

En las condiciones de cultivo ya descritas, al tercer día de incubación, se observa un buen crecimiento por parte del micelio, alcanzando el peso máximo en el quinto día -- del período de incubación (53,2 mg. de peso seco/muestra).

En la figura XI, se encuentran representados los valores de los grados de autólisis alcanzados por el hongo (ordenadas), con el tiempo de incubación (abscisas), observándose, que el grado de autólisis aumenta progresivamente a largo del período de incubación, desde un 36,7% para el día 12 -- de crecimiento, hasta un 80,3% a los 63 días.

Variación del pH en la autólisis.-

En la siguiente tabla se encuentran agrupados los valores de pH presentados por este hongo a lo largo del período de incubación.

<u>Días</u>	<u>pH</u>
4	3,6
5	3,7
12	6,4
49	6,6
63	6,7

Observando estos valores, podemos ver que la fase -- de autólisis, transcurre a un pH del orden de 6,6 unidades.

Valoración de enzimas líticas.-

Los resultados de las valoraciones enzimáticas llevadas a cabo, en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo y extracto de micelio, así como los correspondientes a las actividades enzimáticas retenidas por las paredes de 4 días, se encuentran agrupadas en la tabla VII.

La cantidad de proteínas valoradas en precipitados proteínicos del líquido de cultivo y del extracto de micelio, fueron respectivamente, 9,73 y 1,6 mg. de proteína/muestra.

Paredes celulares.-

Las paredes celulares obtenidas, fueron de edades comprendidas entre 4 y 63 días.

Grado de lisis con el tiempo de incubación.-

En la tabla IV, se encuentran representados los grados de lisis alcanzados por las paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación. Los blancos de paredes sin herc vir, de hasta 49 días, experimentan lisis a lo largo de las 120 horas de incubación, producida por el efecto lítico endógeno de las enzimas que estas paredes retienen. Los blancos de paredes de 63 días no presentan ninguna alteración. Los grados de lisis alcanzados por estas paredes, se encuentran agrupados en la tabla VI.

La lisis progresiva experimentada por las paredes jóvenes (4 días) y viejas (63 días), con el tiempo de incubación (horas), se encuentra representada en la figura XII, en esta, la curva cuyos puntos se indican por el signo ●, corresponde a la de las paredes jóvenes y la curva que lleva sus --

puntos representados por el signo O es la correspondiente a las paredes viejas.

En la figura XIII, se encuentran representados los grados de lisis (ordenadas) alcanzados a las 120 horas de incubación, por las paredes de diferentes edades (abscisas), en esta figura la curva cuyos puntos están representados por el signo ● corresponde a los grados de lisis de las paredes, con las enzimas existentes en el precipitado proteínico del líquido de cultivo y la curva cuyos puntos llevan el signo O es la correspondiente a los grados de lisis alcanzados por las paredes por acción de las enzimas que ellas mismas retienen.

Valoraciones realizadas en los hidrolizados después de 120 horas de lisis.-

Los resultados de estas valoraciones se encuentran agrupados en la tabla V.

Microscopía óptica.-

Como ya se indicó en la parte experimental, las paredes de este hongo tienen tendencia a adherirse unas con otras cuando se encuentran en suspensión, debido a lo cual fué difícil obtener fotografías claras que muestren la morfología de estas paredes observadas al microscopio óptico. En las figuras 1 y 2, podemos observar la morfología de las paredes de 4 días y en las figuras 3 y 4, la de las paredes de 63

días.

Microscopía electrónica.-

La morfología externa que presentan las paredes de este hongo, fué observada al microscopio electrónico, en paredes sombreadas (4 días) con Au/Pd . Esta morfología puede observarse en la fotografía 1, en la que se puede ver la consistencia granular de la pared. La fotografía 2, muestra el cambio de estructura sufrido por la pared después de 24 horas de lisis, que puede traducirse en una pérdida del retículo granular, haciéndose más poroso y por una pérdida de consistencia de sus bordes.

Protoplastos.-

Los protoplastos producidos en este hongo pueden observarse en las figuras de la 1 a la 8. En las primeras horas de incubación se observa el contenido citoplasmático dentro de las hifas, con numerosos cuerpos esféricos brillantes (fig. 1 y 3). Después de la segunda hora de incubación empiezan a salir los primeros protoplastos, los cuales presentan diferentes tamaños (Fig. 1 y 2), muchos de ellos presentan abundante contenido citoplasmático (fig.7) y otros presentan contenido vacuolar, observándose unos con una gran vacuola (Fig.8) y --- otros que poseen más de una (Fig.6).

La autenticidad de estos protoplastos, se comprobó mediante choque osmótico en agua destilada , produciéndose -

la rotura de todos ellos, después de suspenderlos en agua des-
tilada.

La cantidad de protoplastos obtenida a las 24 horas
de incubación fué de $6,5 \cdot 10^4$ por mg. de peso seco de mice--
lio.

TABLA IV - Neurospora crassa

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación en la solución enzimática.

<u>PAREDES</u>	<u>HORAS</u>							
<u>Días</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
4	19.4	29.0	41.9	51.6	54.8	54.8	58.1	58.1
12	10.3	17.2	24.1	37.9	41.4	43.1	43.1	43.1
49	6.9	6.9	10.3	31.0	34.5	34.5	36.8	36.2
63	8.4	12.5	12.5	20.8	27.1	27.1	31.2	31.2

TABLA V - Neurospora crassa

Carbohidratos totales, sustancias reductoras, glucosa y N-acetilglucosamina, procedentes de las paredes celulares después de 120 horas de hidrólisis.

<u>PAREDES</u>	<u>Microgramos/miligramo de paredes</u>			
<u>Días</u>	<u>Carb.T.</u>	<u>Subt.red.</u>	<u>Glucosa</u>	<u>N-acet.</u>
4	450.0	191.2	118.5	37.6
12	413.0	164.7	92.3	24.5
49	375.0	143.5	110.3	20.8
63	225.0	23.9	10.1	0.0

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes e
dades, por las enzimas existentes en las mismas,
con el tiempo de incubación.

[illegible]

TABLA VII - Enzimas líticas de Neurospora crassa

- a) Actividades encontradas por muestra en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio - en cultivos de 70 días.
- b) Actividad específica en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- c) Actividades retenidas por miligramo de paredes jóvenes (4 días).

ENZIMAS	a		b		c
	mU/muestra		mU/mg proteínas		mU/mg pared
	L.C.	Ext.M.	L.C.	Ext.M.	
Quitinasa	622.00	15.00	63.92	9.80	0.00
β -N-acet.	966.00	63.40	99.28	39.30	1.00
Fosf. Acid.	4132.00	193.60	424.67	120.20	2.60
Fosf. Alc.	466.00	65.10	47.89	40.40	0.00
β -1-3 gluc.	21720.00	404.80	2232.27	251.30	13.20
Invertasa	27720.00	2411.20	2848.92	1497.20	17.20
Celulasa	920.00	140.80	94.55	87.40	0.00
Dextranasa	1200.00	206.80	123.33	128.40	10.20
Poligalact.	1292.00	220.00	132.79	142.10	38.20
α -1-4 gluc.	2132.00	387.20	219.12	240.00	--
β -1-6 gluc.	452.00	228.80	46.45	42.10	--
Amilasa	16800.00	281.60	1726.62	174.80	12.60



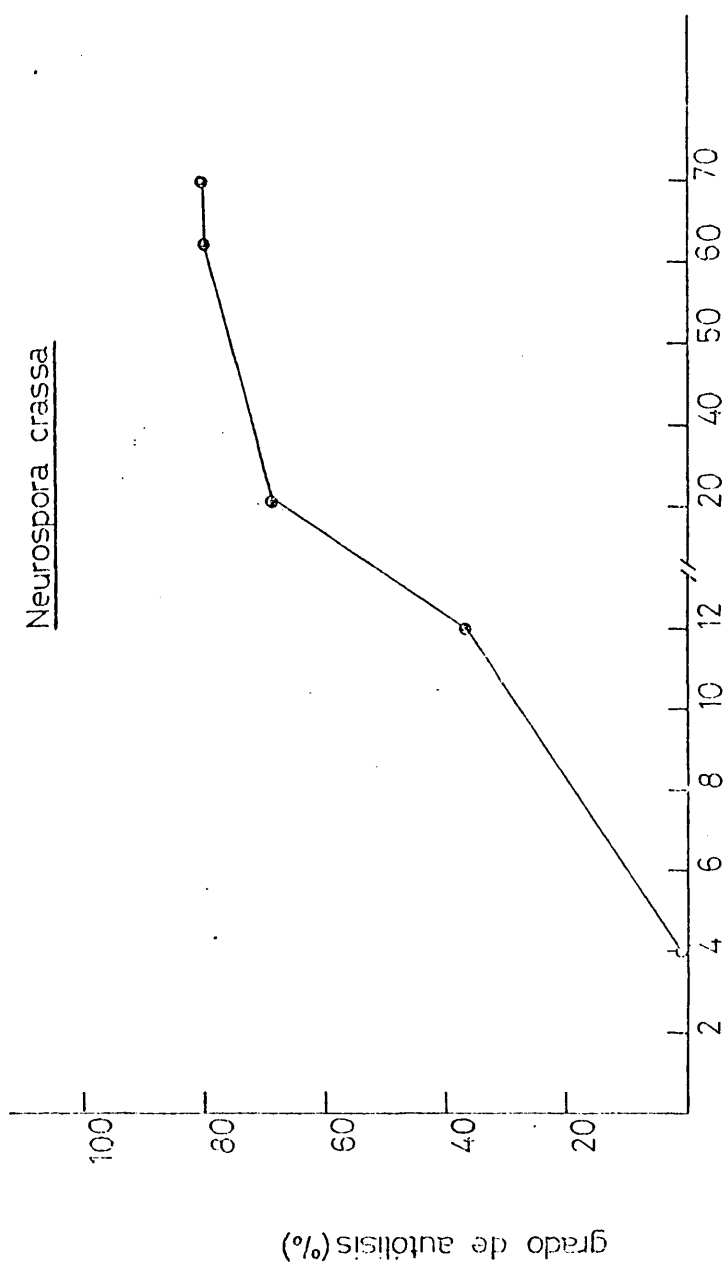


FIG. XI

periodo de incubación (días)

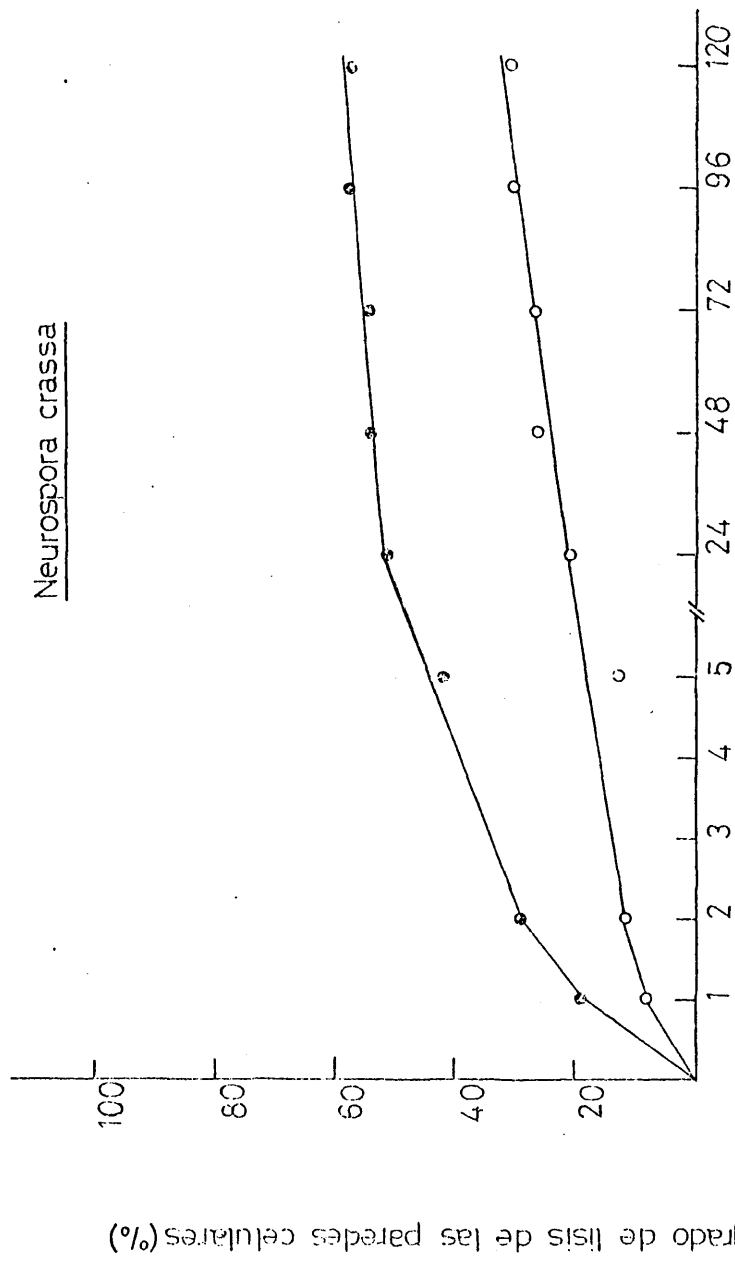
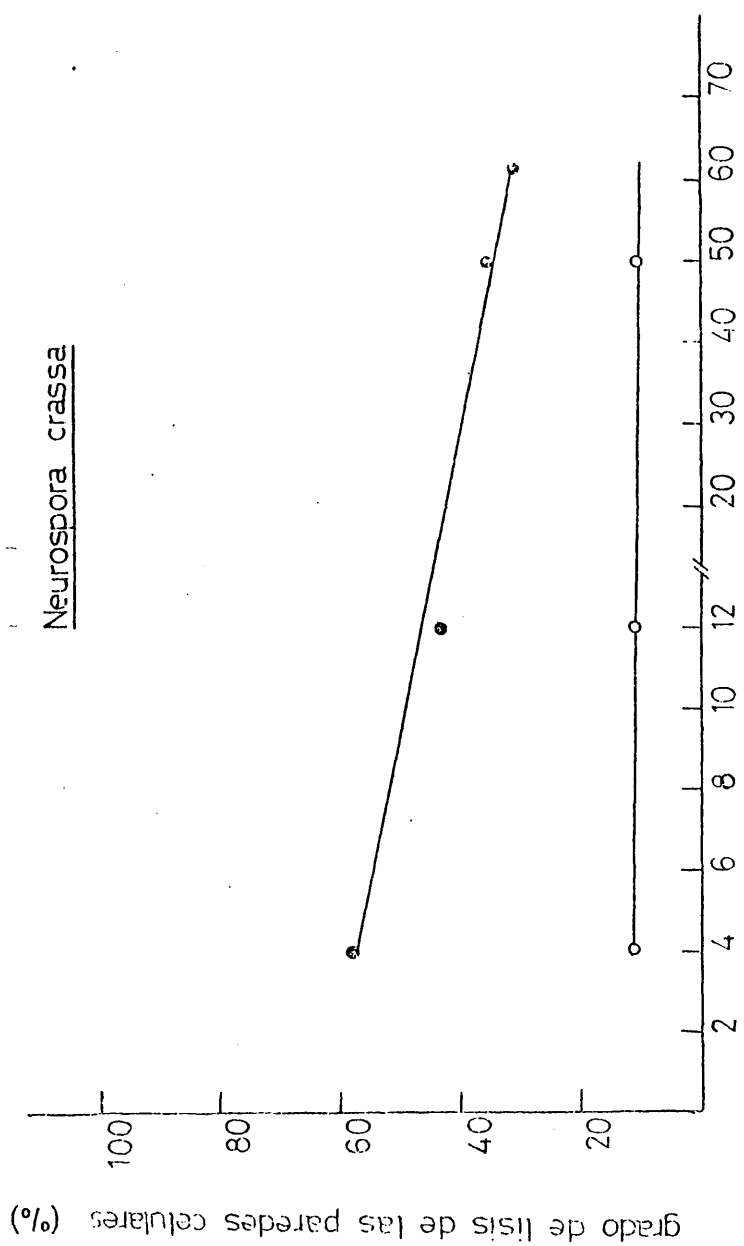


FIG. XII 113

tiempo de incubación (horas)



paredes de diferentes edades (días) FIG. XIII

Neurospora crassa

115

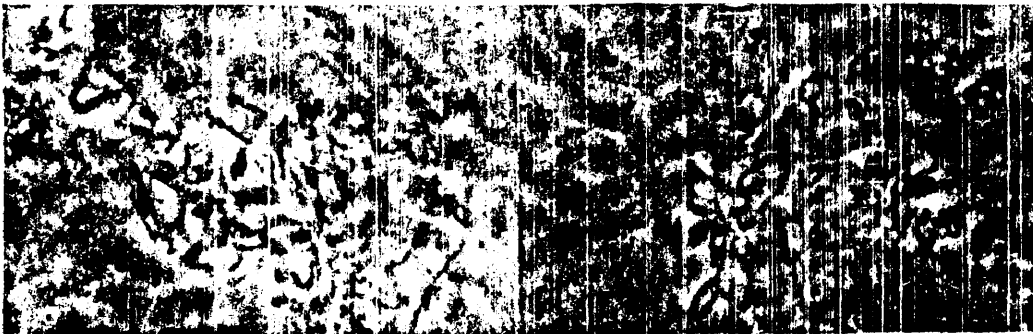


Fig.1

Fig.2

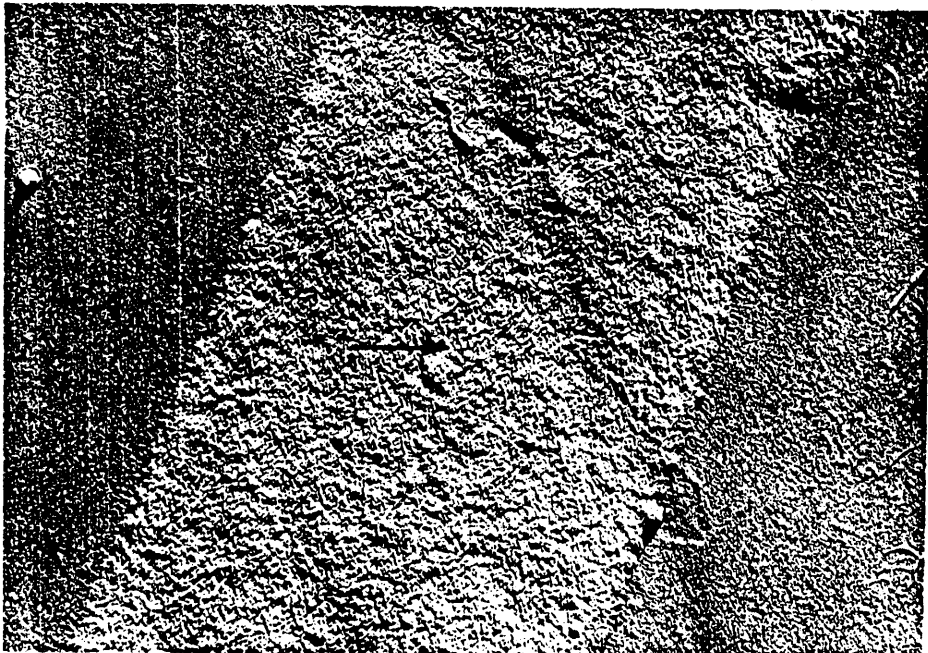
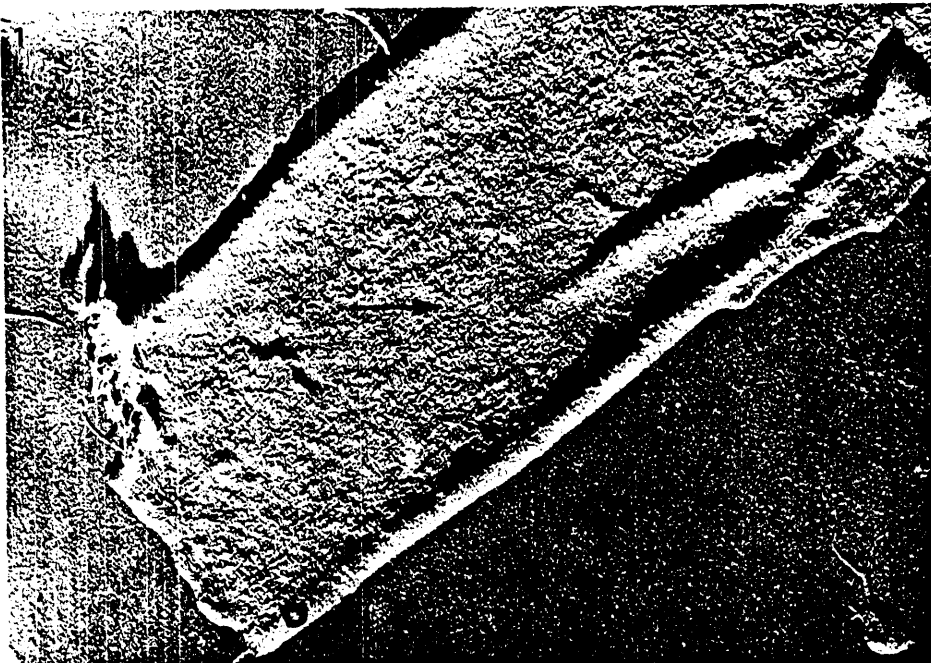


Fig.3

Fig.4

Neurospora crassa

116



Neurospora crassa

117

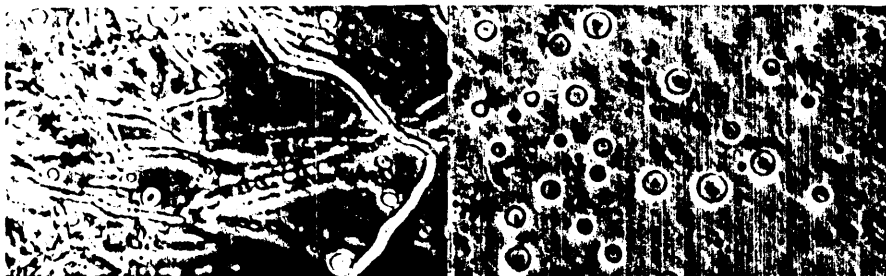


Fig. 1

Fig. 2



Fig. 3

Fig. 4



Fig. 5

Fig. 6



Fig. 7

Fig. 8

Neurospora crassa.-

Fig. 1 y 2 : Paredes celulares de 4 días observadas al microscopio óptico (con objetivo de 1000 aumentos)

Fig 3 y 4 : Paredes celulares de 63 días (objetivo de 1000)

Foto 1 : Paredes de 4 días (sombreado Au/Pd) x 30.800

Foto 2 : Paredes de 4 días después de 24 horas de lisis (Au/Pd)
x 32.200

Fig. 1 a la fig. 8 : Aspecto morfológico presentado por el micelio y por los protoplastos liberados , al ser observados al microscopio óptico.
(manitol 0,8 M)

Aspergillus nidulansGrado de autólisis.-

El micelio de este hongo presenta un buen crecimiento a las 48 horas de incubación, alcanzando el peso máximo al cuarto día de crecimiento (102,8 mg. de peso seco/muestra).

El grado de autólisis aumenta progresivamente a lo largo del período de incubación, desde un valor de 11,2% en el día sexto de crecimiento, hasta alcanzar un 78,8% a los 63 días de crecimiento. En la figura XIV, se encuentran representados los diferentes grados de lisis alcanzados (%), con el tiempo de incubación (días).

Variación de pH en la autólisis.-

Los valores de pH alcanzados a lo largo del período de incubación se encuentran agrupados en la siguiente tabla.

<u>Días</u>	<u>pH</u>
3	5,6
4	4,1
6	6,6
14	8,0
49	7,2
63	7,0

Estos datos indican que la fase de autólisis transcurre a un pH del orden de 7 unidades.

Valoración de enzimas líticas.-

Los resultados obtenidos en las valoraciones enzimáticas realizadas en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo y del extracto de micelio, así como los correspondientes a las valoraciones enzimáticas retenidas por las paredes de 3 días, se encuentran agrupados en la tabla X. La cantidad de proteína detectadas en los precipitados del líquido de cultivo y del micelio, fué respectivamente de 7,27 y 1,4 - mg. de proteína por muestra.

Paredes celulares.-

En este hongo se obtuvieron paredes de edades comprendidas entre 3 y 63 días.

Grado de lisis con el tiempo de incubación.-

Los grados de lisis alcanzados por las paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación se encuentran agrupados en la tabla VIII. Los blancos de paredes hervidas y sin hervir no presentan ninguna alteración durante las 120 horas de incubación.

La lisis progresiva experimentada por las paredes jóvenes (3 días) y por las viejas (63 días), con el tiempo de incubación (en horas), se encuentra representada en la figura XV. En esta figura, la curva cuyos puntos están indicados con el signo ●, corresponde al grado de lisis de las paredes jóvenes, mientras que la curva que lleva sus puntos señalados -

con el signo O, corresponde a la lisis de las paredes viejas.

En la figura XVI, se han representado los grados de lisis (ordenadas) alcanzados a las 120 horas de incubación, - por las paredes de diferentes edades (abscisas).

Valoraciones realizadas en los hidrolizados después de 120 horas de lisis.-

Los resultados correspondientes a estas valoraciones representados en la tabla IX.

Microscopía óptica.-

El aspecto que presentan las paredes celulares de este hongo, al microscopio óptico puede observarse en las figuras 1 y 2, correspondientes a paredes de 3 días y en las figuras 3 y 4, en las que se ven paredes viejas, en estas fotografías las paredes pueden verse limpias de contenido citoplasmático.

Microscopía electrónica.-

Las paredes de 3 días fueron observadas al microscopio electrónico antes y después del ataque enzimático, en preparaciones sombreadas con Au/Pd. En la fotografía 1, se puede observar la estructura externa que presentan las paredes jóvenes (antes del ataque enzimático), formada por un conjunto de microfibrillas entrecruzadas. En la fotografía 2, puede verse el aspecto que presentan estas paredes a las 20 horas de lisis, observándose su superficie más granulosa y con numerosos

puntos de ataque en forma de oquedades.

Protoplastos.-

Los protoplastos de este hongo empiezan a producirse a partir de las 3 horas de incubación en pequeñas cantidades, alcanzando su máxima producción a las 24 horas.

El aspecto que presentan estos protoplastos al microscopio óptico puede observarse en las figuras de la 1 a la 6, en las que puede verse dos tipos bien definidos: unos con poco contenido citoplasmático y muy transparentes, los cuales se distinguen muy bien de las esporas que se encuentran en el medio (fig. 1, 2, 3 y 4) y otros con abundante contenido y menos transparentes. También se ha observado que los protoplastos que tardan más en salir son vacuolados, pudiendo presentar una o más vacuolas. (fig.4).

Los protoplastos producidos, son auténticos ya que cuando se les suspende en agua destilada, como consecuencia del choque osmótico sufrido se rompen, cosa que no ocurre con las esporas.

El rendimiento de protoplastos obtenido a las 24 horas de incubación fué de $9,2 \cdot 10^4$ por mg. de peso seco de micelio.

TABLA VIII - Aspergillus nidulans

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación en la solución enzimática.

<u>PAREDES</u>	<u>HORAS</u>							
<u>Días</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
3	8.3	8.3	8.3	11.2	22.3	22.3	52.8	52.8
4	2.9	2.9	2.9	7.1	18.6	28.6	32.9	47.1
6	6.2	9.2	11.6	10.8	21.5	24.6	35.4	43.5
14	12.3	12.3	12.3	15.8	28.1	28.1	28.1	40.0
49	0.0	2.7	2.7	2.7	10.8	10.8	32.4	38.5
63	5.2	6.9	6.9	6.9	19.0	20.7	22.4	22.4

TABLA IX - Aspergillus nidulans

Carbohidratos totales, sustancias reductoras, glucosa y N-acetilglucosamina, procedentes de las paredes celulares después de 120 horas de hidrólisis.

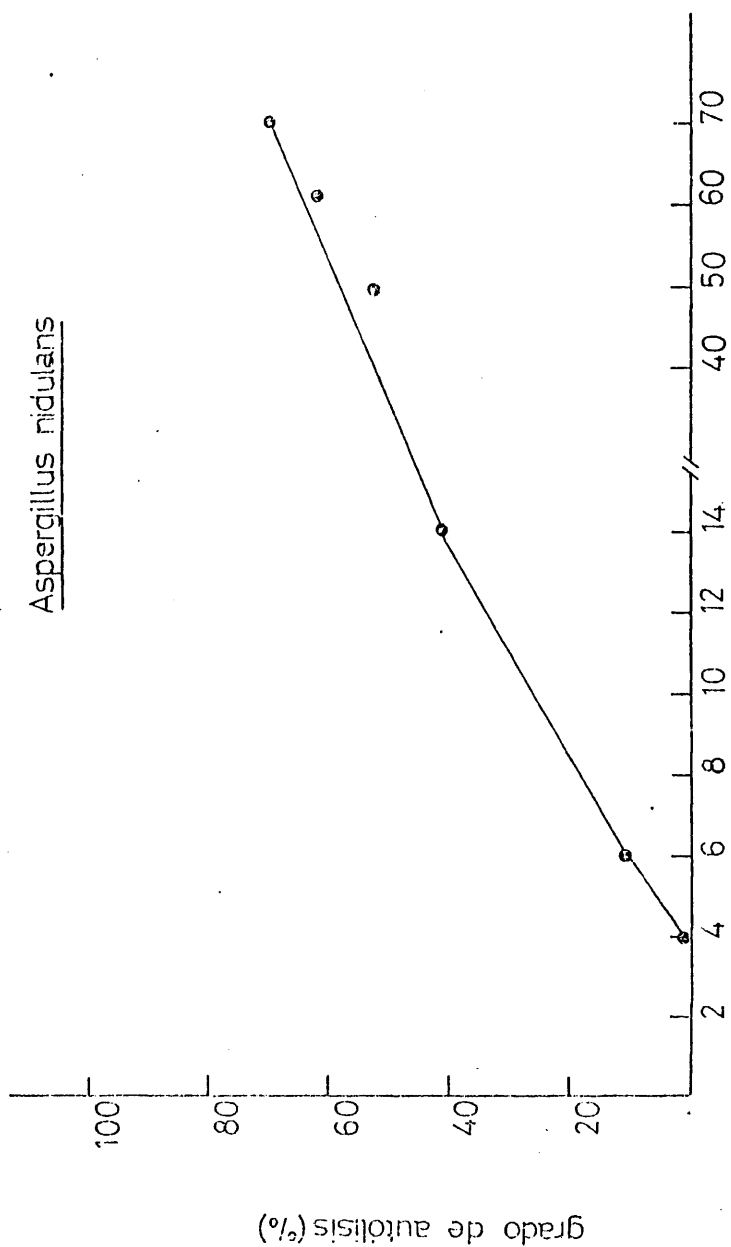
<u>PAREDES</u>	<u>Microgramos/miligramo de paredes</u>			
<u>Días</u>	<u>Carb.T.</u>	<u>Subt.red.</u>	<u>Glucosa</u>	<u>N-acet.</u>
3	152.0	116.8	49.5	67.6
4	323.0	116.8	78.8	43.3
14	226.0	175.3	45.0	67.6
49	--	63.7	25.9	37.6
63	--	103.5	42.8	48.8

TABLA X - Enzimas líticas de Aspergillus nidulans

- a) Actividades encontradas por muestra en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio - en cultivos de 70 días.
- b) Actividad específica en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- c) Actividades retenidas por miligramo de paredes jóvenes (3 días).

ENZIMAS	a		b		c
	mU/muestra		mU/mg proteínas		mU/mg pared
	<u>L.C.</u>	<u>Ext.M.</u>	<u>L.C.</u>	<u>Ext.M.</u>	
Quitinasa	2810.0	225.3	386.5	160.6	0.0
β -N-acet.	0.0	85.4	0.0	61.0	0.6
Fosf. Acid.	90.0	35.2	12.4	25.2	3.4
Fosf. Alc.	66.0	2.2	9.2	1.6	0.0
β -1-3 gluc.	2532.0	440.0	348.3	314.4	8.2
Invertasa.	3000.0	114.4	412.7	81.7	8.0
Celulasa.	180.0	167.2	24.8	119.5	5.6
Dextranasa.	0.0	114.4	0.0	81.7	15.0
Poligalact.	0.0	44.0	0.0	31.4	40.6
β -1-4 gluc.	0.0	220.0	0.0	157.2	--
β -1-6 gluc.	0.0	85.4	0.0	61.0	--
Amilasa.	180.0	--	24.8	--	18.2
α -1-3 gluc.	1.3	--	0.2	--	1.3

Aspergillus nidulans



periodo de incubación (días)

FIG. XIV

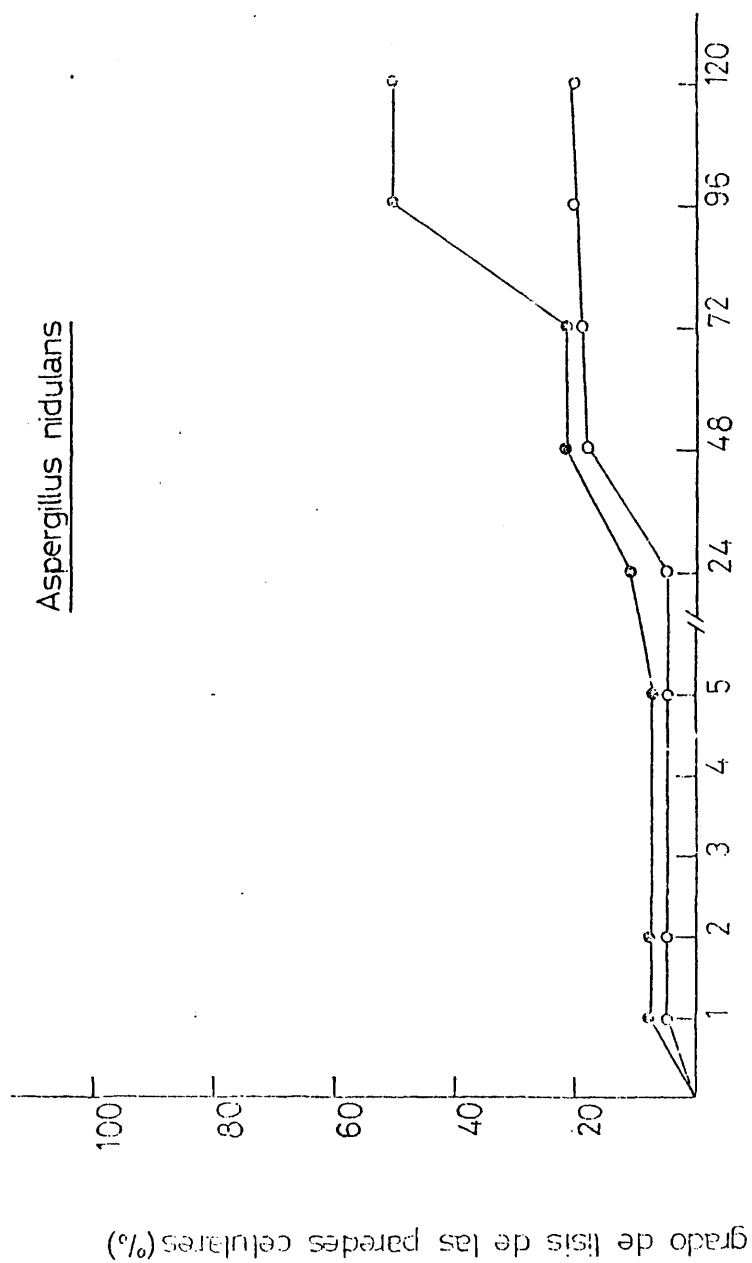
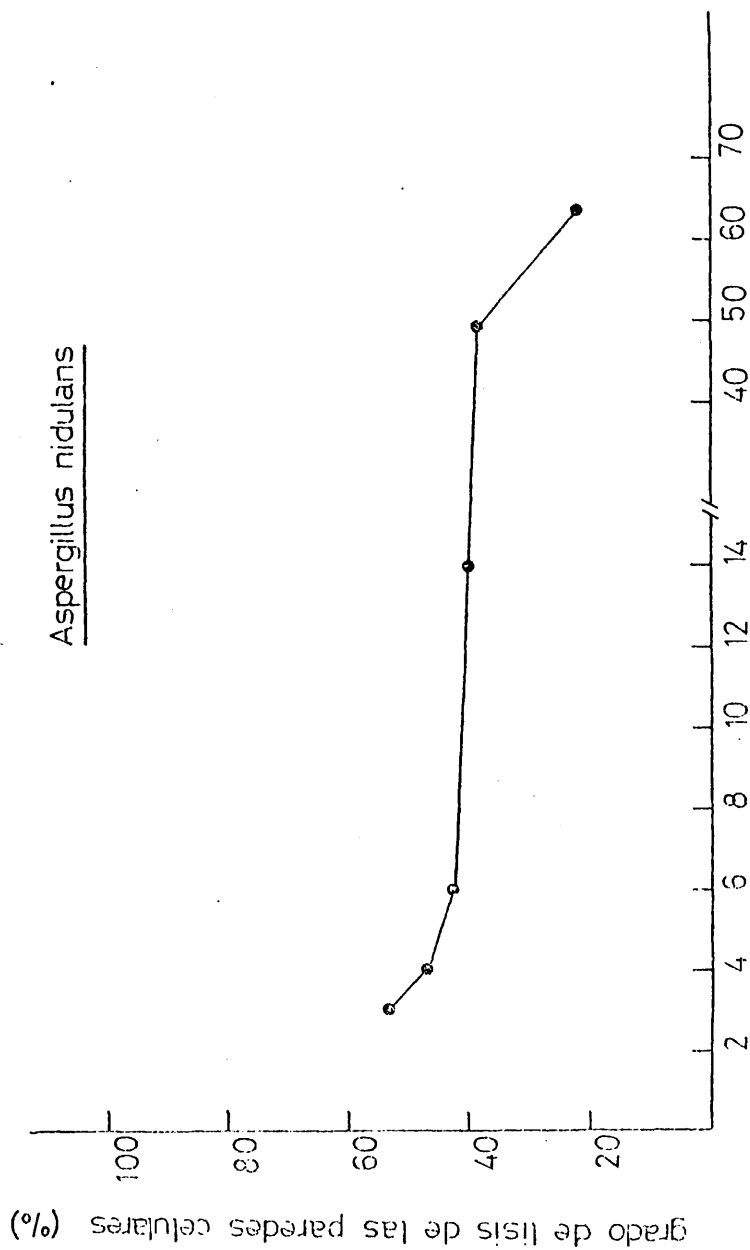


FIG. XV



1:6

paredes de diferentes edades (días) FIG. XVI

Aspergillus nidulans 137



Fig.1



Fig.2

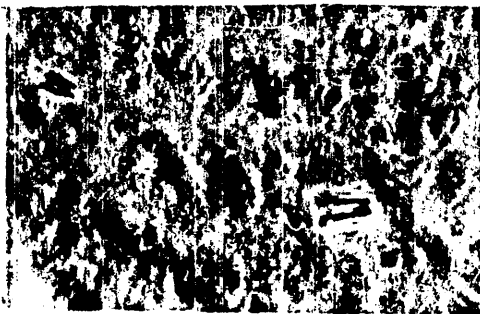


Fig.3

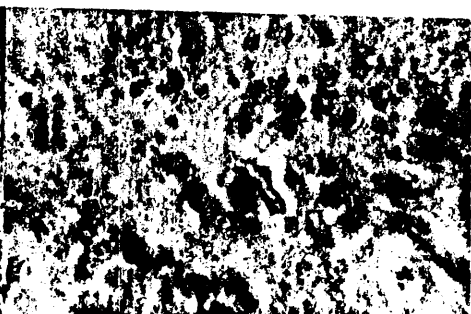
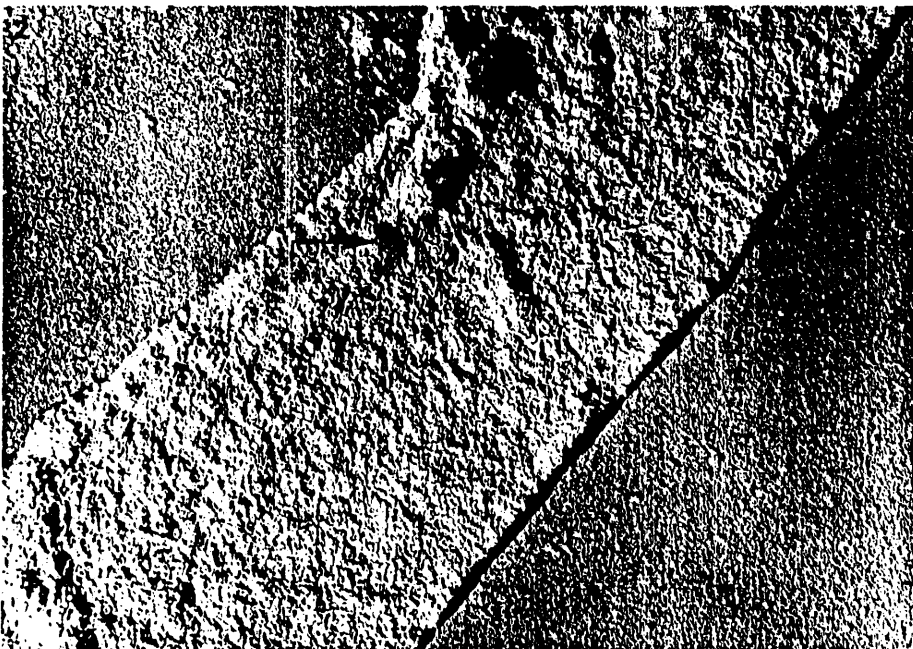
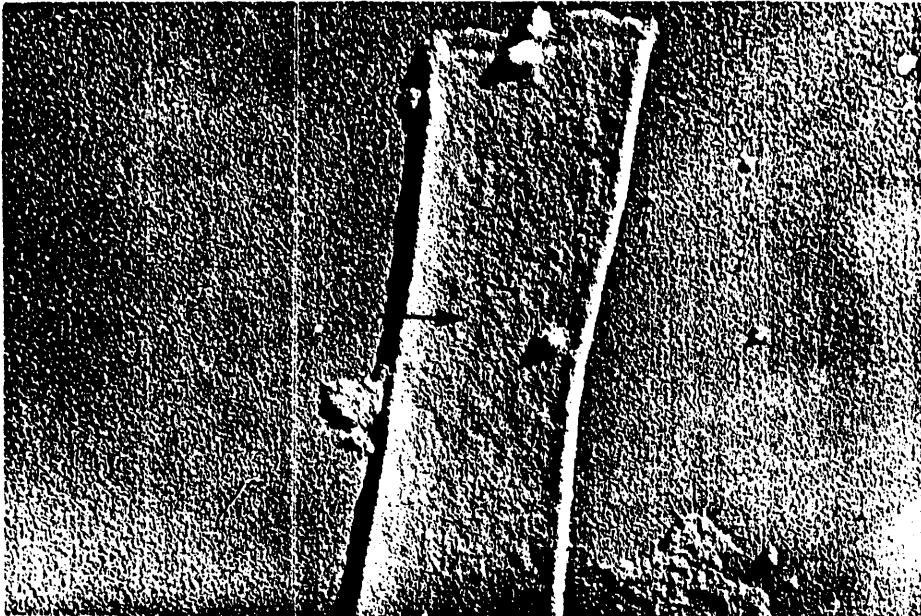


Fig.4

Aspergillus nidulans 128



Aspergillus nidulans 129

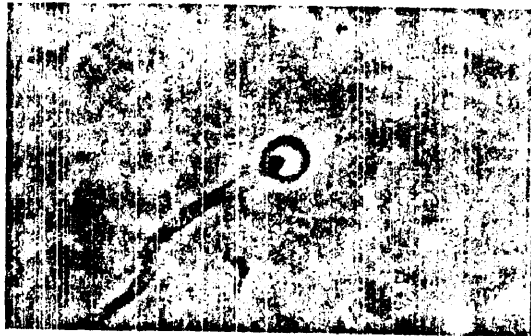


Fig.1



Fig.2



Fig.3



Fig.4



Fig.5



Fig.6

Aspergillus nidulans.-

Fig. 1 y 2 : Paredes celulares de 3 días, vistas al microscopio
óptico(con objetivo de 1000 aumentos)

Fig. 3 y 4 : Paredes celulares de 63 días, observadas al microscopio
óptico con objetivo de 1000 aumentos.

Foto 1 : Paredes de 3 días sombreadas con Au/Pd x 30.000

Foto 2 : Paredes celulares de 3 días, después de 20 horas de lisis
x 32.800

Fig. 1 a la Fig. 6 : Protoplastos liberados (Galactosa 0,8 M, --
Cl₂Ca al 3%), observados al microscopio óptico (contraste de fase 1000 aumentos)

Polystictus versicolor.-Grado de autólisis.-

En el tercer día del período de incubación, se observa un buen crecimiento del micelio, alcanzando el peso máximo en el séptimo, (73,7 mg. de peso seco/muestra).

El grado de autólisis varía desde un valor del --- 12,9% (día 10) hasta alcanzar un 76% a los 63 días de incubación. En la figura XVII, se han representado los diferentes grados de autólisis (%) alcanzados con el tiempo de incubación (días).

Variación de pH en la autólisis.-

Los valores de pH alcanzados durante el período de incubación, se encuentran en la siguiente tabla.

<u>Días</u>	<u>pH</u>
5	3,0
7	3,6
10	3,7
14	6,2
63	6,2

Como se puede observar al principio de la autólisis el pH existente es ácido, alcanzando un valor de 6,2 a partir del día 14.

Valoración de enzimas líticas.-

Los resultados de las valoraciones enzimáticas realizadas en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo y del extracto de micelio, así como los correspondientes a las valoraciones enzimáticas retenidas por las paredes de 3 días, se encuentran agrupados en la tabla XIII. La cantidad de proteínas obtenidas en los precipitados del líquido de cultivo y del extracto de micelio, fué respectivamente de 7,2 y 1,8 mg. de proteínas/muestra.

Paredes celulares.-

En este hongo se obtuvieron paredes celulares de -- edades comprendidas entre 4 y 63 días.

Grado de lisis con el tiempo de incubación.-

Los grados de lisis alcanzados por las paredes de -- diferentes edades con el tiempo de incubación se encuentran agrupados en la tabla XI. Los blancos de paredes hervidas y -- sin hervir, no presentan alteraciones a lo largo de las 120 -- horas de incubación.

La lisis progresiva experimentada por las paredes -- jóvenes (4 días) y por las viejas (63 días), con el tiempo de incubación (horas), se encuentra representada en la figura -- XVIII. En esta figura la curva cuyos puntos están indicados -- con el signo ● , corresponde al grado de lisis de las paredes jóvenes; la curva cuyos puntos están señalados con el signo ⊙

corresponde a la lisis de las paredes viejas.

En la figura XIX, se han representado los grados de lisis (ordenadas) alcanzados a las 120 horas de incubación, - por las paredes de diferentes edades (abscisas).

Valoraciones realizadas en los hidrolizados después de 120 horas de lisis.-

Los resultados correspondientes a estas valoraciones se encuentran representados en la tabla XII.

Microscopía óptica.-

El aspecto que presentan las paredes celulares al - microscopio óptico, puede observarse en las figuras 1 y 2, correspondientes a paredes de 4 días y en las figuras 3 y 4, en las que se observan las paredes viejas de 63 días. En estas - fotografías pueden verse las paredes limpias de contenido citoplasmático.

Microscopía electrónica.-

La estructura externa que presentan las paredes jóvenes de 4 días, se observó al microscopio electrónico en - preparaciones sombreadas con Au/Pd.. En la fotografía uno, se observa que estas paredes presentan un aspecto granuloso, antes del ataque enzimático. En la fotografía 2, se puede observar el aspecto que presentan estas paredes después de 48 horas de lisis, apreciándose un cambio del aspecto granuloso por la aparición de una estructura fibrilar.

Protoplastos.-

En las condiciones ya descritas los protoplastos empiezan a liberarse en el medio de cultivo a partir de las ---tres primeras horas de incubación. Los protoplastos formados presentan diferencia de tamaño y de contenido citoplasmático, como puede verse en las figuras comprendidas entre la 1 y la 11. Muchos de ellos pueden observarse dentro de las hifas --- (Fig. 5, 6 y 7) o libres en el medio (fig. 3, 8, 9, 10 y 11), observándose en algunos contenido vacuolar (fig. 8). Muchas veces se observan fenómenos de fusión entre ellos (fig. 10).

Estos protoplastos eran sensibles al choque osmótico, cuando se agitaban en agua destilada.

La cantidad de protoplastos producidos a las 24 horas de incubación fué de $1,3 \cdot 10^5$ protoplastos por mg de peso seco de micelio.

TABLA XI - Polystictus versicolor

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación en la solución enzimática.

<u>PAREDES</u>	<u>HORAS</u>							
<u>Días</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
4	6.2	6.2	9.4	37.5	40.7	43.7	56.3	56.3
7	0.0	0.0	10.0	13.4	20.0	23.4	23.4	26.7
10	0.0	0.0	7.1	14.3	16.0	16.0	18.2	22.8
14	0.0	0.0	3.3	6.5	9.7	9.7	13.0	16.1
63	0.0	0.0	3.9	3.9	3.9	7.7	7.7	7.7

TABLA XII - Polystictus Versicolor

Carbohidratos totales, substancias reductoras y N-acetilglucosamina, procedentes de las paredes celulares después de 120 horas de hidrólisis.

<u>PAREDES</u>	<u>Microgramos/miligramo de paredes</u>			
<u>Días</u>	<u>Carb.T.</u>	<u>Subt.red.</u>	<u>Glucosa</u>	<u>N-acet.</u>
4	120.0	115.2	110.3	9.5
7	--	--	68.4	0.0
10	105.0	104.0	68.4	0.0
14	95.0	90.0	80.8	3.8
63	76.0	81.2	68.4	3.8

TABLA XIII - Enzimas líticas de Polystictus versicolor

- a) Actividades encontradas por muestra en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- b) Actividad específica en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- c) Actividades retenidas por miligramo de paredes jóvenes (4 días).

ENZIMAS	a		b		c
	mU/muestra		mU/mg proteínas		mU/mg pared
	L.C.	Ext.M.	L.C.	Ext.M.	
Quitinasa	200.00	23.50	27.77	12.90	0.00
β -N-acet.	625.00	66.00	66.94	36.20	0.80
Fosf.Acid.	200.00	56.30	27.77	30.90	2.00
Fosf.Alc.	6.00	9.70	0.83	5.30	--
β -1-3 gluc.	8332.00	255.20	1157.22	140.10	8.20
Invertasa	11952.00	1337.60	1657.22	734.30	6.80
Celulasa	1200.00	30.10	166.66	16.50	6.80
Dextranasa	32.00	0.00	4.44	0.00	9.00
Poligalact.	1800.00	114.40	250.00	62.80	41.60
β -1-4 gluc.	1400.00	0.00	194.44	0.00	--
β -1-6 gluc.	666.00	44.00	92.50	24.20	--
Amilasa	2932.00	132.00	407.22	72.40	10.20

Los resultados son la media de tres experimentos.

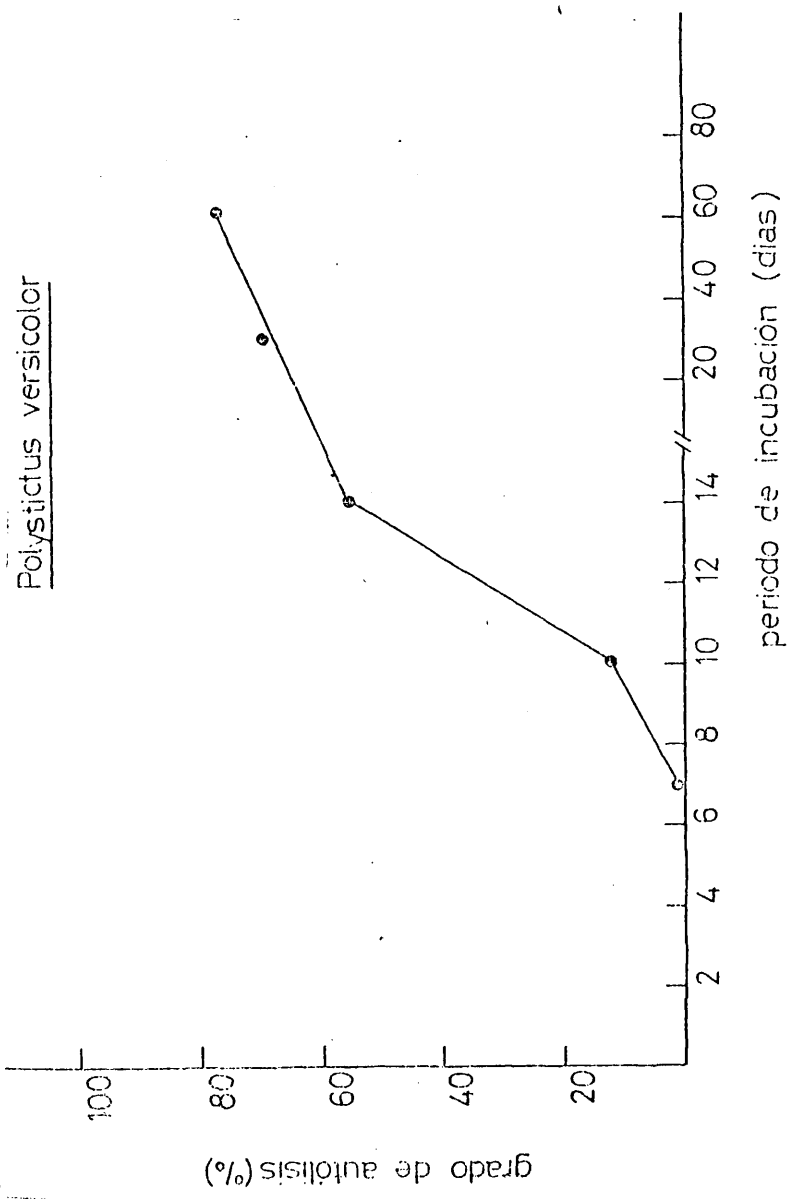


FIG. XVII

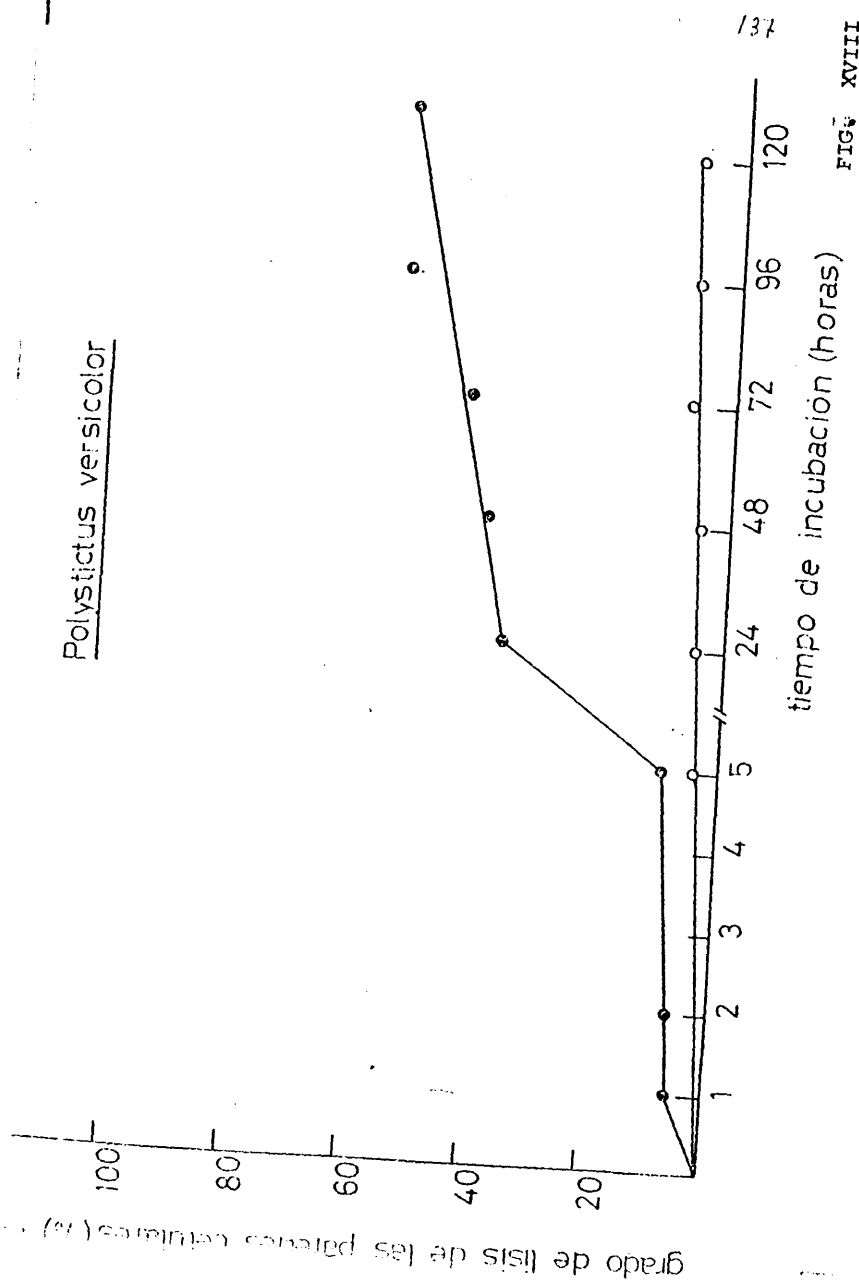
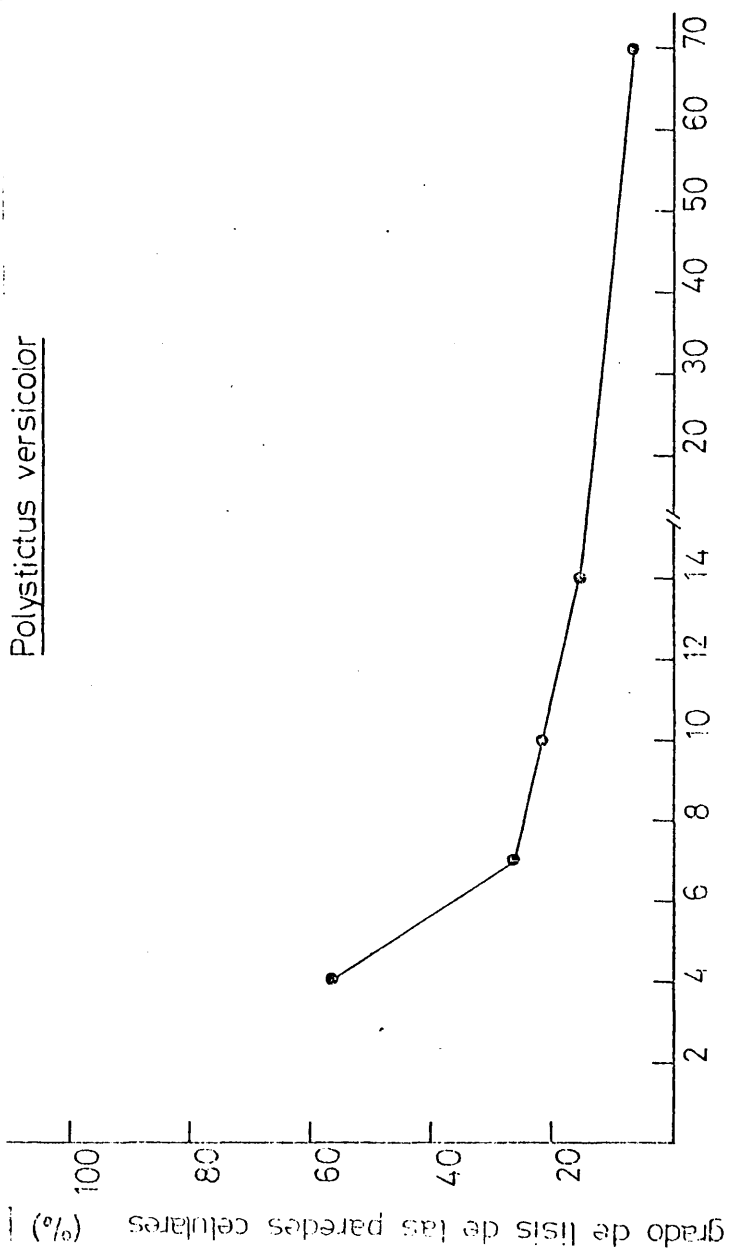


FIG. XVIII



18

paredes de diferentes edades (días) FIG. XIX

Polystictus versicolor

Fig. 1

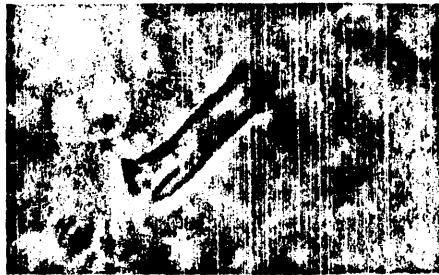


Fig. 2

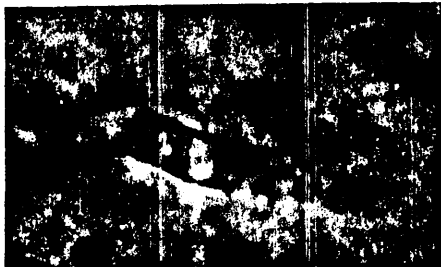
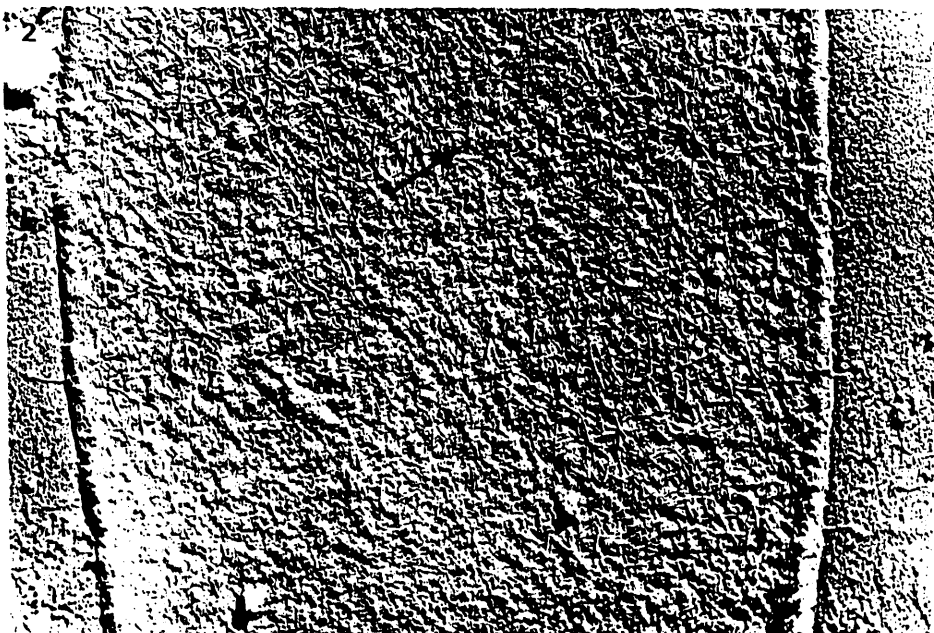


Fig. 3



Fig. 4

Polystictus versicolor 1/40



Polystictus versicolor 141



Polystictus versicolor 142



Fig.4

Fig.5



Fig.6

Fig.7



Fig.8

Fig.9

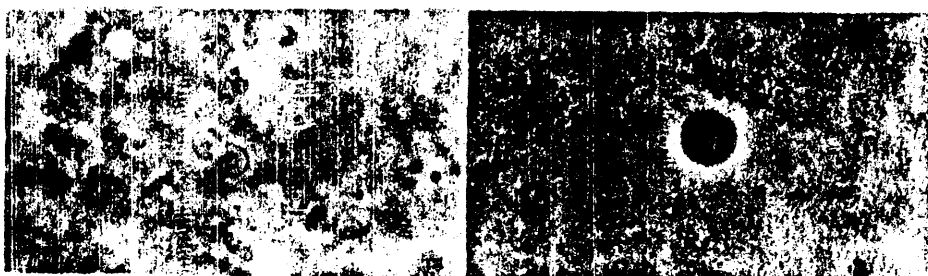


Fig.10

Fig.11

Polystictus versicolor.-

Fig.1 y 2 : Paredes celulares de 4 días vistas al microscopio -
óptico (contraste de fase x 1000)

Fig. 3 y 4 : Paredes celulares de 63 días (contraste de fase --
x 1000)

Foto 1 : Paredes celulares de 4 días sombreadas con Au/Pd, obser-
vadas al microscopio electrónico x 36.200

Foto 2 : Paredes celulares de 4 días después de 48 horas de li-
sis (Au/Pd) x 36.700.

Fig. 1 a la Fig. 11 : Aspecto morfológico que presenta el micelio de este hongo (2 días) y los protoplas-
tos formados , al ser observados al micros-
copio óptico (contraste de fase x1000).

(SO₄Mg 0,8 M.)

Aspergillus nigerGrado de autólisis.-

A las 24 horas de incubación se observa un crecimiento considerable del micelio, alcanzando el peso máximo a las 72 horas (134,3 mg. de peso seco/muestra).

El grado de autólisis experimenta un aumento a lo largo del período de incubación, desde un valor de 32,1%, en el día séptimo de crecimiento, hasta un 80,0% a los 63 días.

En la figura XX, se encuentran representados los diferentes grados de lisis alcanzados (%), con el tiempo de incubación (días).

Variación de pH en la autólisis.-

Los valores de pH alcanzados a lo largo del período de incubación, pueden observarse en la siguiente tabla.

<u>Días</u>	<u>pH</u>
2	6,7
3	5,1
7	7,9
15	8,1
49	7,5
63	6,7

Estos datos indican que la fase autolítica transcurre a pH básico, llegando a ser neutro al final del proceso.

Valoración de enzimas líticas.-

Los resultados obtenidos en las valoraciones enzimáticas llevadas a cabo en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo y del extracto de micelio, así como los correspondientes a las valoraciones enzimáticas retenidas por las paredes de 3 días, se encuentran agrupados en la tabla XVI. La cantidad de proteínas valoradas en los precipitados del líquido de cultivo y del extracto de micelio, fué respectivamente de 6,6 y 2,1 mg. de proteína/muestra.

Paredes celulares.-

Las paredes celulares obtenidas, fueron de edades comprendidas entre 2 y 63 días.

Grado de lisis con el tiempo de incubación.-

Los grados de lisis alcanzados por las paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación, se encuentran agrupados en la tabla XIV. Los blancos de paredes hervidas y sin hervir, no presentan ninguna alteración a lo largo de las 120 horas de incubación.

La lisis experimentada por las paredes jóvenes (3 días) y por las viejas (63 días), con el tiempo de incubación (horas), se encuentra representada en la figura XXI. En esta figura, la curva cuyos puntos están indicados con el signo ● corresponde al grado de lisis de las paredes jóvenes, y la indicada con el signo o, corresponde a la lisis de las paredes viejas.

En la figura XXII, se han representado los grados - de lisis (ordenadas) alcanzados a las 120 horas de incubación, por las paredes de diferentes edades (abscisas).

Valoraciones realizadas en los hidrolizados después de 120 horas de lisis.-

Los resultados correspondientes a estas valoraciones, se encuentran representados en la tabla XV.

Microscopía óptica.-

La morfología que presentan las paredes de este hongo al microscopio óptico, puede observarse en las figuras 1 y 2 (paredes jóvenes) y en las figuras 3 y 4 (paredes viejas). Las paredes en estas fotografías se observan limpias de contenido citoplasmático.

Microscopía electrónica.-

La estructura que presentan las paredes jóvenes de 3 días, se observa al microscopio electrónico en preparaciones sombreadas con Au/Pd. En la fotografía 1 se observa, el aspecto que presentan estas paredes antes del ataque enzimático, mostrando un aspecto granuloso. En la fotografía 2 puede observarse el cambio que experimenta la ultraestructura - después de 48 horas de ataque.

Protoplastos.-

En el conjunto fotográfico formado por las figuras.

comprendidas entre la 1 a la 6, puede observarse la morfología presentada por los protoplastos de este hongo. La mayoría de ellos presenta poco contenido citoplasmático.

La autenticidad de estos protoplastos se comprobó - por la sensibilidad presentada al choque osmótico.

El máximo rendimiento de protoplastos obtenidos se contabilizó a las 24 horas, siendo de $1,5 \cdot 10^5$.

TABLA XIV - Aspergillus niger

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación en la solución enzimática.

<u>PAREDES</u>	<u>HORAS</u>							
	<u>Días</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>		
	2	0.0	5.5	5.5	5.5	20.5		
	3	0.0	3.6	3.6	14.3	24.3		
	7	3.1	6.2	6.2	6.2	21.9		
	14	0.0	3.0	3.0	7.4	19.2		
	49	0.0	3.8	3.8	6.2	17.8		
	63	0.0	7.4	7.4	7.4	18.5		

TABLA XV - Aspergillus niger

Carbohidratos totales, sustancias reductoras, glucosa y N-acetilglucosamina, procedentes de las paredes celulares después de 120 horas de hidrólisis.

<u>PAREDES</u>	<u>Microgramos/miligramo de paredes</u>			
<u>Días</u>	<u>Carb. T.</u>	<u>Subt.red.</u>	<u>Glucosa</u>	<u>N-acet.</u>
2	247.0	181.5	179.2	10.7
3	247.0	148.5	140.4	8.3
14	228.1	121.0	115.2	8.8

TABLA XVI - Enzimas líticas de Aspergillus niger

- a) Actividades encontradas por muestra en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- b) Actividad específica en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- c) Actividades retenidas por miligramo de paredes jóvenes (3 días).

ENZIMAS	a		b		c
	ml/muestra		ml/mg proteínas		mlU/mg pared
	L.C.	Ext.M.	L.C.	Ext.M.	
Quitinasa	14.00	0.50	2.12	0.20	0.00
β -N-acet.	214.00	37.80	52.42	18.10	2.00
Fosf. Acid.	0.00	2.00	0.00	1.10	23.80
Fosf. Alc.	66.00	--	10.00	--	0.00
β -1-3 gluc.	11480.00	334.40	1739.39	160.30	12.60
Invertasa	0.00	123.20	0.00	59.10	9.00
Celulasa	266.00	212.20	40.30	101.30	7.00
Dextranasa	0.00	38.70	0.00	18.50	13.80
Poligalact.	1456.00	316.80	222.12	151.80	38.20
β -1-4 gluc.	0.00	--	0.00	--	--
β -1-6 gluc.	86.00	--	13.33	--	--
Amilasa	0.00	281.60	0.00	135.00	20.80

Los resultados son la media de tres experimentos

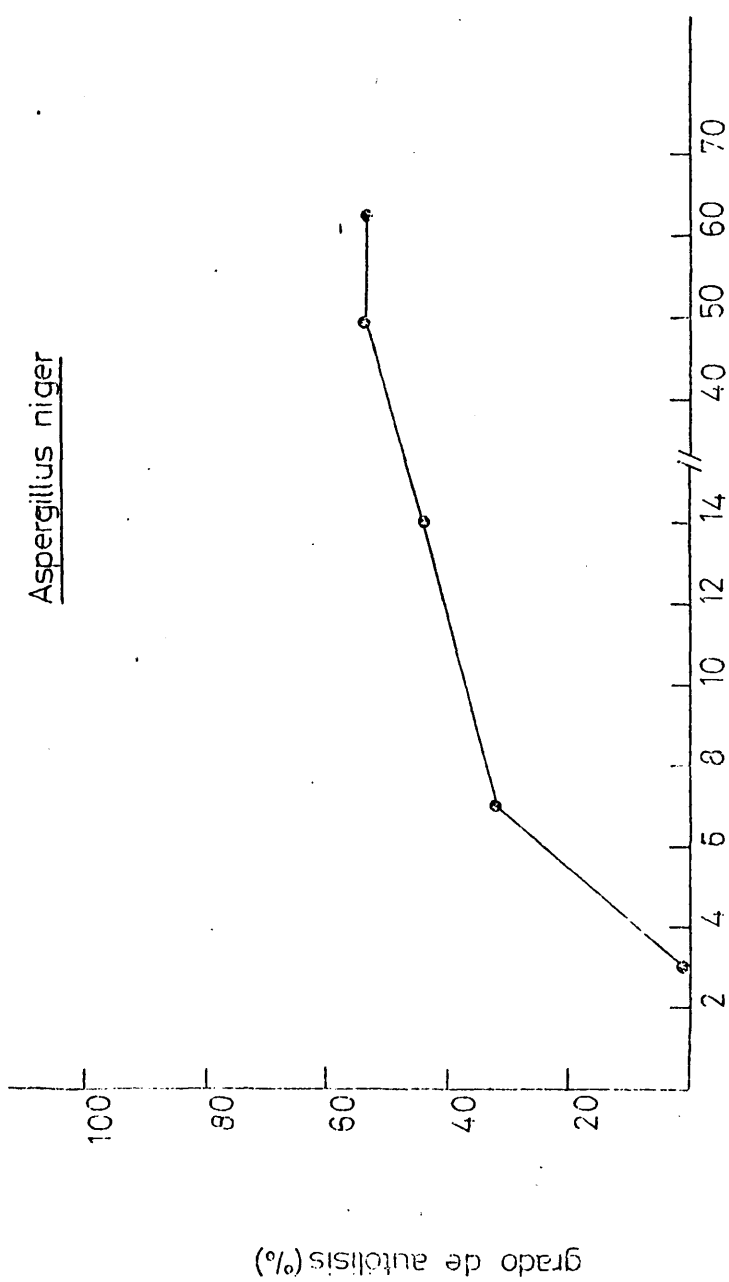


FIG. XX

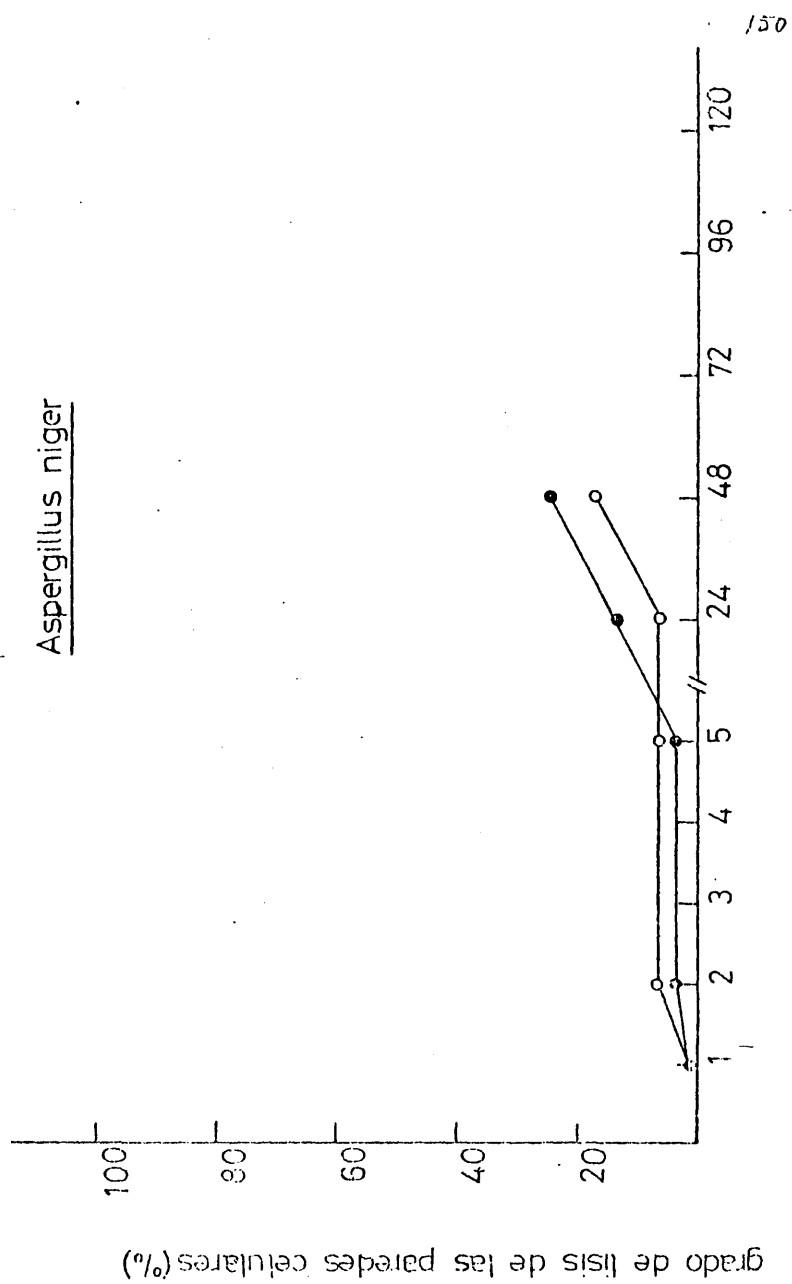
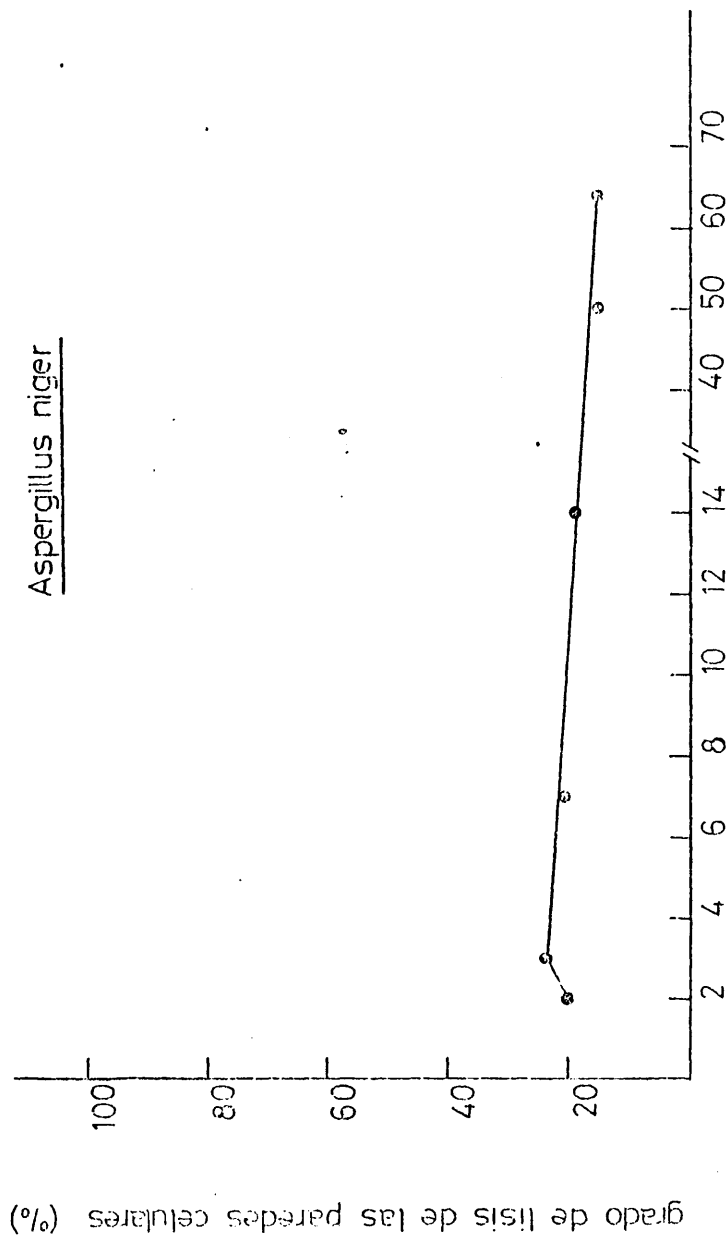


FIG. XXI

tiempo de incubación (horas)

Aspergillus niger



paredes de diferentes edades (días) FIG. XXII

15~

Aspergillus niger



Fig.1



Fig.2



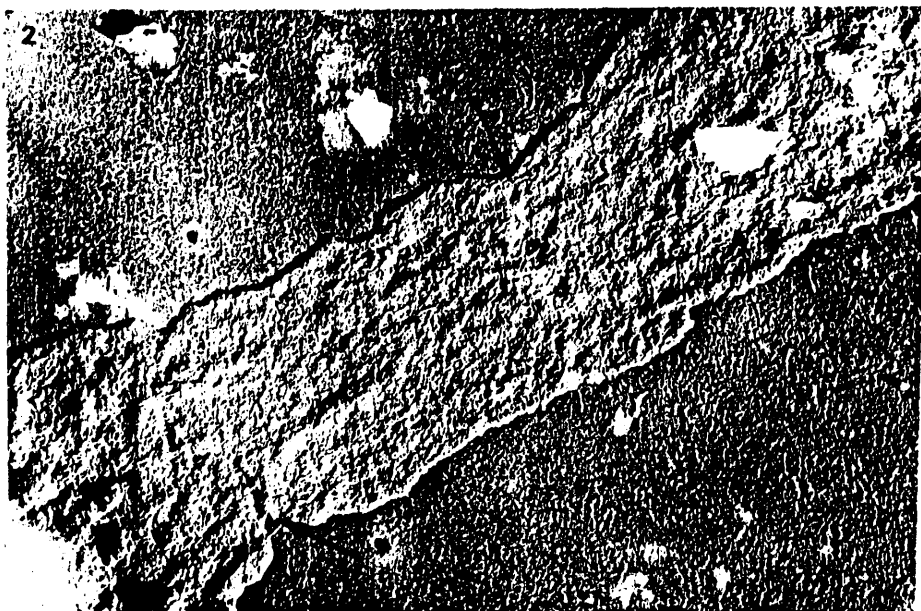
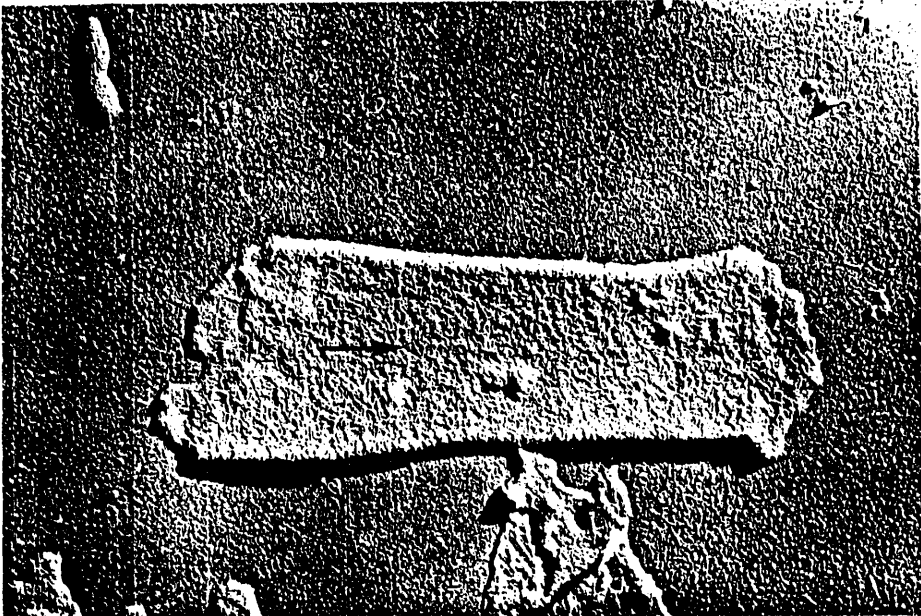
Fig.3



Fig.4

Aspergillus niger

153



Aspergillus niger

157



Fig.1



Fig. 2



Fig.3

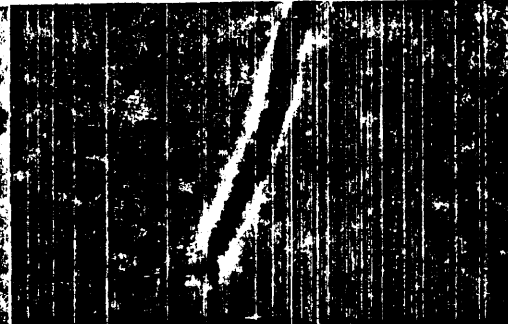


Fig.4



Fig.5



Fig.6

10/10

Aspergillus niger.-

Fig.1 y 2 : paredes celulares de 3 días observadas al microscopio óptico (contraste de fase x 1000)

Fig.3 y 4 : paredes celulares de 60 días (contraste de fase -- x 1000)

Foto 1 : paredes celulares de 3 días sombreadas con Au/Pd .
x 30.800

Foto 2 : paredes celulares de 3 días después de 48 horas de lisis (sombreado Au/Pd) x 32.200

Fig. 1 a la 6 : Liberación de protoplastos (galactosa 0,8 M y - Cl_2Ca al 3%), observada al microscopio óptico - (contraste de fase x1000).

Schizophyllum commune

Grado de autólisis.-

En las condiciones ya descritas de cultivo, este hongo presenta un crecimiento más lento que las otras especies estudiadas, alcanzando el peso máximo a los 12 días de incubación (70,5 mg. de peso seco/muestra).

La fase degradativa transcurre lentamente, llegando a un grado de autólisis de un 30% a los 63 días de crecimiento. Cultivos envejecidos de 100 a 120 días, alcanzaron un grado de autólisis de un 60%. En la figura XXIII, se encuentran representados, los diferentes grados de autólisis con el tiempo de incubación.

Variación de pH en la autólisis.-

Los valores de pH alcanzados durante el crecimiento y autólisis, se encuentran en la siguiente tabla.

<u>Días</u>	<u>pH</u>
7	4,0
12	4,4
21	5,5
49	6,3
63	6,5

Como se puede observar la autólisis transcurre a pH casi neutro.

Valoración de enzimas líticas.-

Los resultados correspondientes a estas valoraciones, - se encuentran agrupados en la tabla XX.

La cantidad de proteínas obtenidas en los precipitados del líquido de cultivo y del extracto de micelio, fué de 13,1 y - 3,04 mg. de proteínas/muestra.

Paredes celulares.-

En este hongo se obtuvieron paredes entre 7 y 63 días - de edad.

Grado de lisis con el tiempo de incubación.-

Los resultados obtenidos se encuentran agrupados en la tabla XVII. En la tabla XIX, se encuentran representados los grados de lisis de las paredes con sus enzimas endógenas.

La variación en el grado de lisis alcanzado por las paredes jóvenes y viejas con el tiempo de incubación, se encuentra representada en la figura XXIV. En esta figura la curva cuyos puntos están indicados por el signo •, corresponde a paredes jóvenes y - la otra curva corresponde a paredes viejas.

En la figura XXV, se encuentran representados los grados de lisis alcanzados a las 120 horas de incubación por paredes de diferentes edades, así como los grados de lisis debidos a la - actividad endógena (curva con puntos claros).

Valoraciones realizadas en los hidrolizados después de 120 horas de lisis.-

Los resultados correspondientes a estas valoraciones, - se encuentran representados en la tabla XVIII.

Microscopía óptica.-

El aspecto que presentan paredes jóvenes al microscopio óptico, puede observarse en las figuras 1 y 2, así como en las -- figuras 3 y 4, el aspecto que presentan las paredes viejas.

Microscopía electrónica.-

El cambio estructural experimentado por paredes jóvenes de 7 días, después de 48 horas de ataque enzimático, puede ser observado en las figuras 1 y 2.

Protoplastos.-

En las figuras comprendidas de la 1 a la 8, puede observarse el aspecto que presentan los protoplastos producidos por este hongo. Muchos de los protoplastos se observan dentro de las -- hifas, junto con pequeñas vacuolas muy refringentes. Los protoplastos liberados al medio son muy opacos al microscopio.

La cantidad de protoplastos producida a las 24 horas de incubación fué de $1,2 \cdot 10^5$ por mg. de peso seco de micelio.

Estos protoplastos fueron sensibles al choque osmótico en agua destilada.

TABLA XVII - Schizophyllum commune

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación en la solución enzimática,

<u>PAREDES</u> <u>Días</u>	<u>HORAS</u>							
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
7	0.0	0.0	2.4	28.6	31.0	31.0	33.4	40.8
12	2.2	2.2	2.2	25.5	25.5	29.8	31.9	47.0
21	0.0	1.7	6.8	22.1	27.2	30.5	32.2	44.1
49	0.0	0.0	1.0	32.0	36.0	40.0	40.0	40.0
63	0.0	0.0	1.0	32.0	36.0	40.0	40.0	40.0

TABLA XVIII - Schizophyllum commune

Carbohidratos totales, sustancias reductoras, glucosa y N-acetilglucosamina, procedentes de las paredes celulares después de 120 - de hidrólisis.

<u>PAREDES</u> <u>Días</u>	<u>Microgramos/miligramo de paredes</u>			
	<u>Carb.T.</u>	<u>Subt.red.</u>	<u>Glucosa</u>	<u>N-acet.</u>
7	101.3	71.0	40.5	0.0
12	142.5	100.0	45.0	0.0
21	120.0	87.5	45.0	0.0
49	105.0	62.5	42.3	0.0
63	--	50.0	42.3	0.0

TABLA XIX - Schizophyllum commune

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades, por las enzimas existentes en las mismas, con el tiempo de incubación.

<u>PAREDES</u>	<u>HORAS</u>							
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
7	0.0	0.0	5.3	21.1	23.3	36.8	42.1	44.7
21	0.0	0.0	1.9	24.1	24.1	44.5	44.5	44.0
49	0.0	0.0	0.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
63	0.0	0.0	0.0	23.8	23.8	26.2	31.0	40.5

TABLA XX - Enzimas líticas de Schizophyllum commune

- a) Actividades encontradas por muestra en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en --
cultivos de 120 días.
- b) Actividad específica en el líquido de cultivo y
en el extracto de micelio en cultivos de 120 --
días.
- c) Actividades retenidas por miligramo de paredes
jóvenes (7 días).

ENZIMAS	a		b		c
	mU/ muestra		mU/mg proteínas		mU/mg pared
	L.C.	Ext.M	L.C.	Ext.M.	
Quitinasa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -N-acet.	222.0	24.6	16.9	8.1	0.0
Fosf.Acid.	306.0	78.8	23.4	24.6	1.0
Fosf.Alc.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
β -1-3 gluc.	16260.0	3471.7	1241.2	1142.0	4.0
Invertasa	7332.0	3467.2	159.7	991.3	3.2
Celulasa	2132.0	3678.4	162.7	1211.5	2.0
Dextranasa	0.0	906.4	0.0	298.5	12.6
Poligalact.	180.0	924.0	13.7	304.3	36.6
β -1-4 gluc.	3332.0	3379.2	254.7	1113.0	--
β -1-6 gluc.	666.0	1012.0	50.8	333.3	0.0
Aamilasa	3064.0	1196.8	691.9	394.2	6.8
α -1-3 gluc.	0.7	5.1	0.1	0.4	0.1

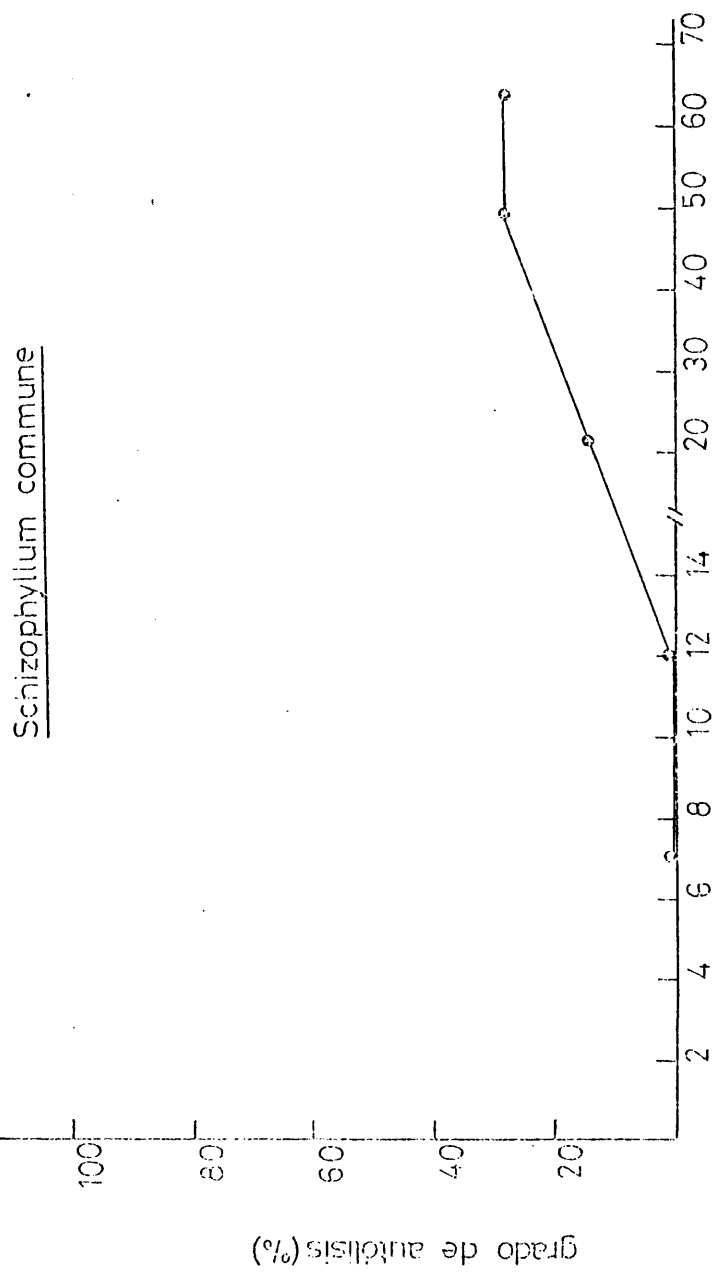
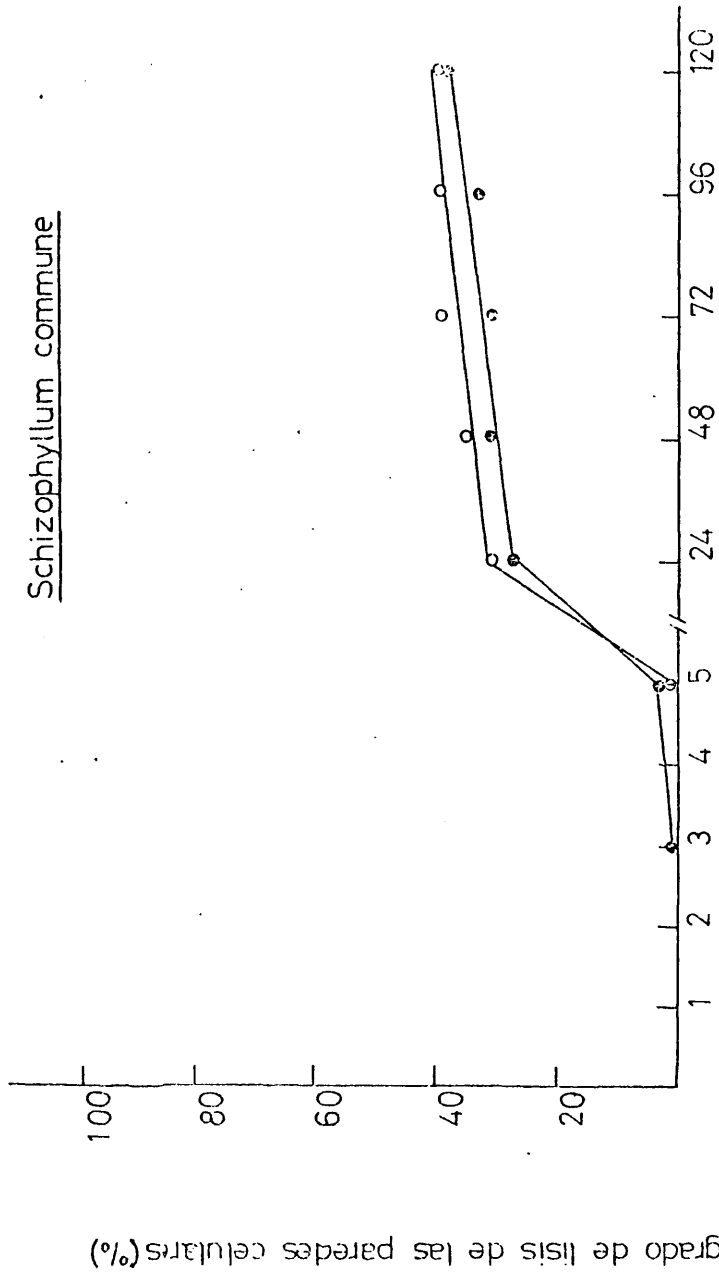


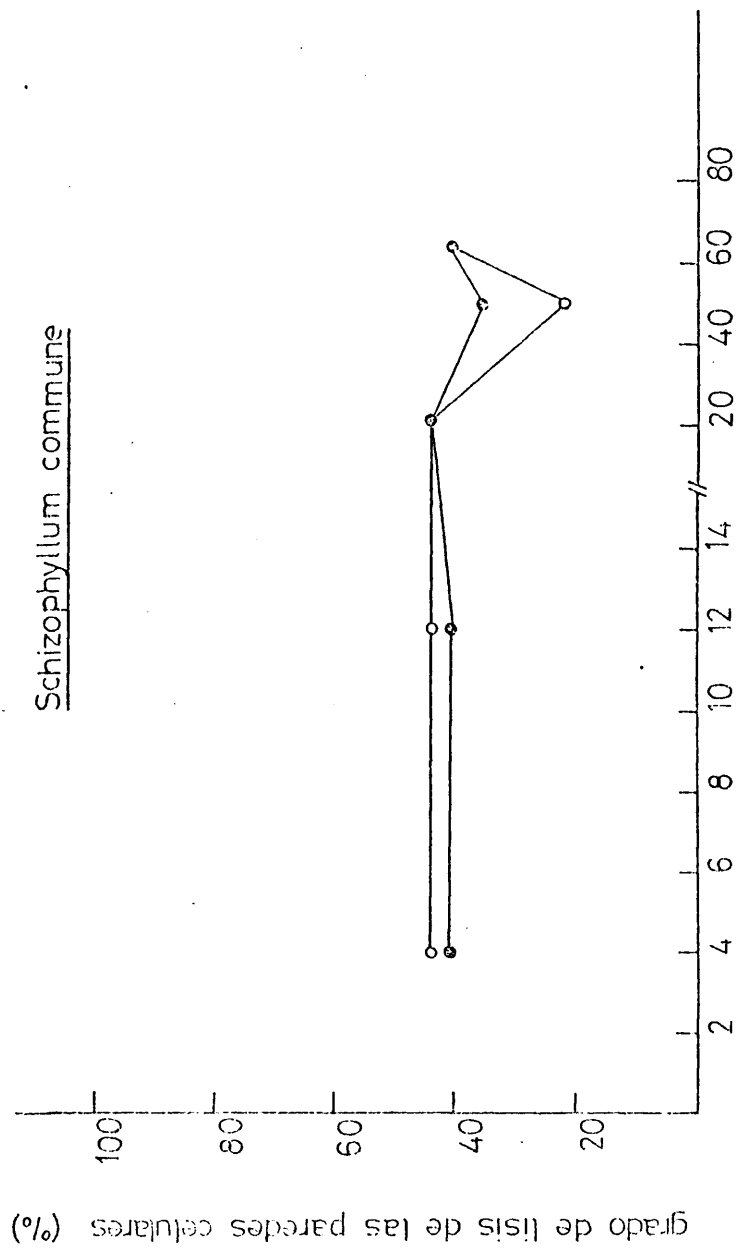
FIG. XXIII
periodo de incubación (dias)

Schizophyllum commune



tiempo de incubación (horas)

FIG. XXIV



paredes de diferentes edades (dias) FIG. XXV

187
Schizophyllum commune



Fig.1



Fig. 2

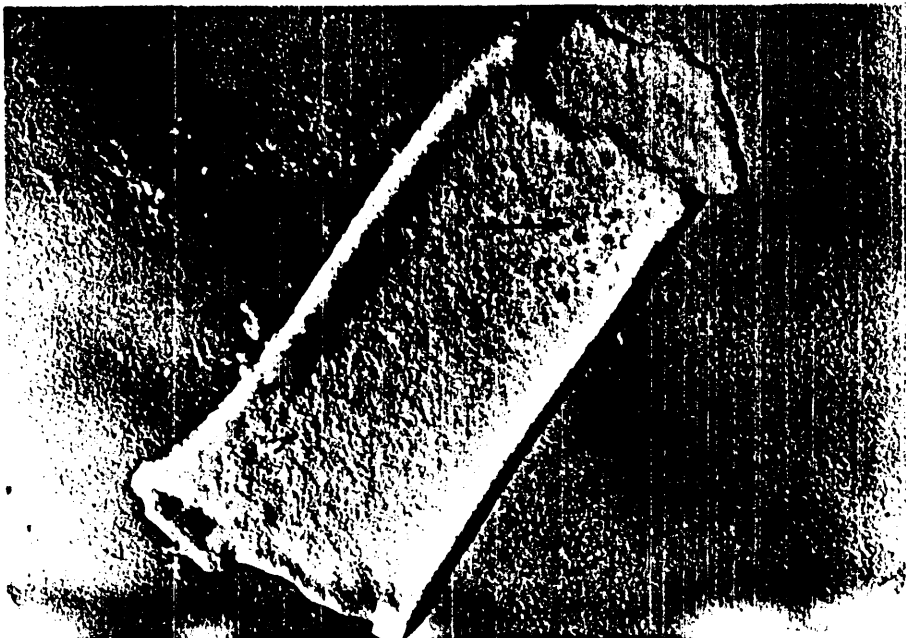
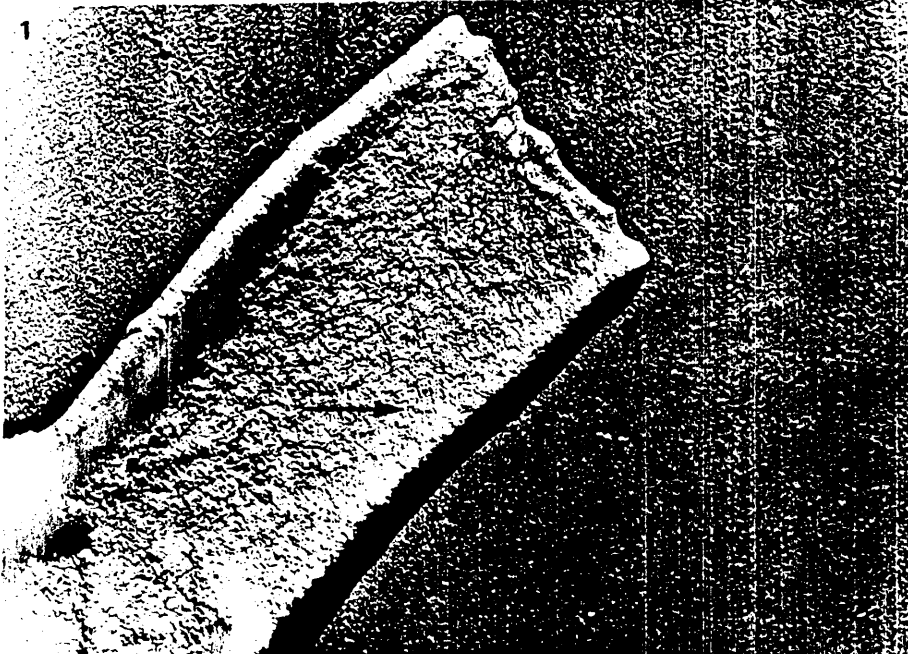


Fig.3



Fig.4

165
Schizophyllum commune



Schizophyllum commune



Fig.1



Fig.2



Fig.3



Fig.4



Fig.5

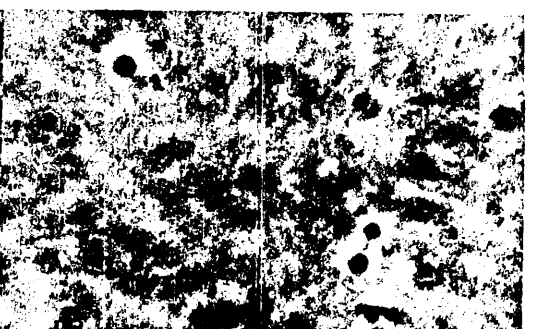


Fig.6



Fig.7



Fig.8

166 10

Schizophyllum commune.-

Fig. 1 y 2 : paredes celulares de 7 días, observadas al microscopio óptico (contraste de fase x 1000)

Fig. 3 y 4 : paredes celulares de 63 días, (contraste de fase - x 1000)

Foto 1 : Paredes celulares de 7 días sombreadas con Au/Pd .
x 30.800.

Foto 2 : Paredes celulares de 7 días, después de 48 horas de li
sis (Au/Pd) x 26.400 .

Fig. 1 a la Fig. 8 : aspecto morfológico que presentan las hifas de este y los protoplastos formados, - observado al microscopio óptico (contraste de fase x 1000). (ClNH_4 0,8 M.).

Mucor mucedoGrado de autólisis.-

Este hongo presenta un buen crecimiento al tercer día de incubación, alcanzando el peso máximo al cuarto día de crecimiento (48,0 mg. de peso seco/muestra).

El grado de autólisis alcanzado en el día sexto de crecimiento fué del 20,6%, aumentando hasta un 50% en el día 63 de incubación.

En la figura XXVI, se encuentran representados los diferentes grados de autólisis alcanzados, con el tiempo de incubación.

Variación de pH en la autólisis.-

Los valores de pH alcanzados durante el período de incubación, se han agrupado en la siguiente tabla.

<u>Días</u>	<u>pH</u>
4	4,6
7	4,5
14	4,4
49	5,7
63	4,8

Como puede observarse toda la fase de autólisis transcurre a pH ácido.

Valoración de enzimas líticas.-

Los resultados de estas valoraciones realizadas en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo y del extracto de micelio, así como los correspondientes a las valoraciones realizadas en paredes de 4 días, se encuentran agrupados en la tabla XXIV.

La cantidad de proteínas obtenidas en los precipitados del líquido de cultivo y del extracto de micelio, fué respectivamente de, 3,0 Y 0,029 mg. de proteína por muestra.

Paredes celulares.-

En este hongo se obtuvieron paredes celulares de edades comprendidas entre 4 y 63 días.

Grado de lisis con el tiempo de incubación.-

Los grados de lisis alcanzados por las paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación, se encuentran agrupados en la tabla XXI. Los blancos de paredes sin hervir presentaron alteraciones a lo largo de las 120 horas de incubación, la lisis que presentan estas paredes con sus propias enzimas endógenas se encuentra representada en la tabla XXIII.

La lisis progresiva experimentada por las paredes jóvenes y viejas con el período de incubación, se encuentra representada en la figura XXVII, en la cual la curva cuyos puntos están señalados con el signo ●, corresponde al grado de lisis de las paredes jóvenes, correspondiendo la otra curva a la lisis de paredes viejas.

En la figura XXVIII, se encuentran representados los --

grados de lisis alcanzados a las 120 horas de lisis por las paredes de diferentes edades. En esta figura la curva con puntos negros, corresponde a la lisis alcanzada por las paredes con las enzimas del precipitado proteínico del líquido de cultivo, y la curva con puntos claros corresponde a la lisis alcanzada por las paredes con sus propias enzimas endógenas.

Valoraciones enzimáticas realizadas en los hidrolizados después de 120 horas de lisis.-

Los resultados correspondientes se encuentran en la tabla XXII.

Microscopía óptica.-

En las figuras 1, 2, 3 y 4 puede observarse el aspecto presentado al microscopio óptico, por las paredes jóvenes (1 y 2) y viejas (3 y 4). Estas paredes carecen de contenido citoplasmático.

Microscopía electrónica.-

En este hongo fué muy difícil observar la estructura -- que presentaban sus paredes jóvenes de 4 días antes del ataque enzimático, debido a las grandes dificultades que se presentaron en la preparación de muestras sombreadas con Au/Pd de las mismas, ya que debido al tamaño de estas paredes como a la tendencia que presentaban estas de agruparse unas con otras sobre la rejilla, se producían frecuentes roturas de la película de formvar. De las múltiples muestras preparadas, solo pudo observarse, la correspon

diente a las paredes 4 días después del ataque enzimático de 48 - horas, como puede verse en la fotografía 1, en la que se observa la superficie externa granulosa de la pared, en la que parecen ob- servarse algunos puntos de ataque.

Protoplastos.-

Los protoplastos en esta especie no empiezan a liberarse al medio hasta después de las tres primeras horas de incubación. Como puede verse en las fotografías formadas por las figuras de la 1 a la 6, estos protoplastos presentan un aspecto muy - tenue, y transparente, pudiendo observarse muy bien su contenido citoplasmático; frecuentemente presentan deformaciones de su membrana (fig.6), distinguiéndose muy bien de sus esporas que también son transparentes pero no presentan estas transformaciones, - (fig. 1 y 5).

Estos protoplastos cuando son agitados con agua destilada, presentan sensibilidad al choque osmótico.

A las 24 horas de incubación el rendimiento de protoplastos producido fué de $1,2 \cdot 10^5$ protoplastos por mg. de peso seco - de micelio.

TABLA XXI - Mucor mucedo

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades con el tiempo de incubación en la solución enzimática.

<u>PAREDES</u>	<u>HORAS</u>							
<u>Días</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>24</u>	<u>48</u>	<u>72</u>	<u>96</u>	<u>120</u>
4	0.0	2.2	6.7	8.9	11.2	13.3	15.6	15.6
7	0.0	5.8	5.8	7.7	9.6	11.5	11.5	11.5
14	0.0	5.2	5.2	8.6	8.6	13.8	13.8	13.8
49	0.0	7.0	9.3	9.3	9.3	11.6	11.6	11.6
63	0.0	3.8	9.6	9.6	9.6	11.5	11.5	11.5

TABLA XXII - Mucor mucedo

Carbohidratos totales, sustancias reductoras, glucosa y N-acetilglucosamina, procedentes de las paredes celulares, después de 120 horas de hidrólisis.

<u>PAREDES</u>	<u>Microgramos/miligramo de paredes</u>			
<u>Días</u>	<u>Carb.T.</u>	<u>Subt.red.</u>	<u>Glucosa</u>	<u>N-acet.</u>
4	--	10.6	4.5	0.0
7	45.0	16.0	4.5	0.0
14	41.3	18.7	6.8	0.0
49	63.8	13.3	4.5	0.0
63	--	13.3	4.5	0.0

TABLA XXIII - Nucor mucosa

Grado de lisis (%) de paredes de diferentes edades, por las enzimas existentes en las mismas, con el tiempo de incubación.

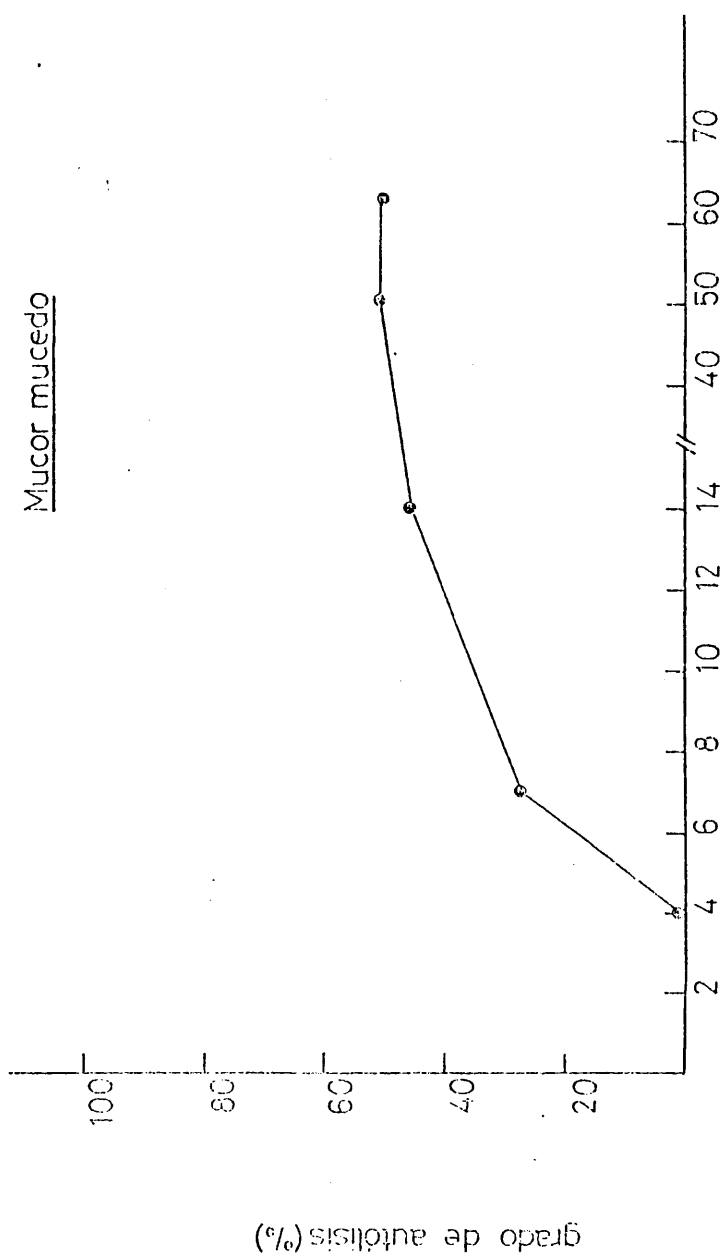
[illegible]

TABLA XXIV - Enzimas líticas del Mucor mucedo

- a) Actividades encontradas por muestra en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- b) Actividad específica en el líquido de cultivo y en el extracto de micelio en cultivos de 70 días.
- c) Actividades retenidas por miligramo de paredes jóvenes (4 días).

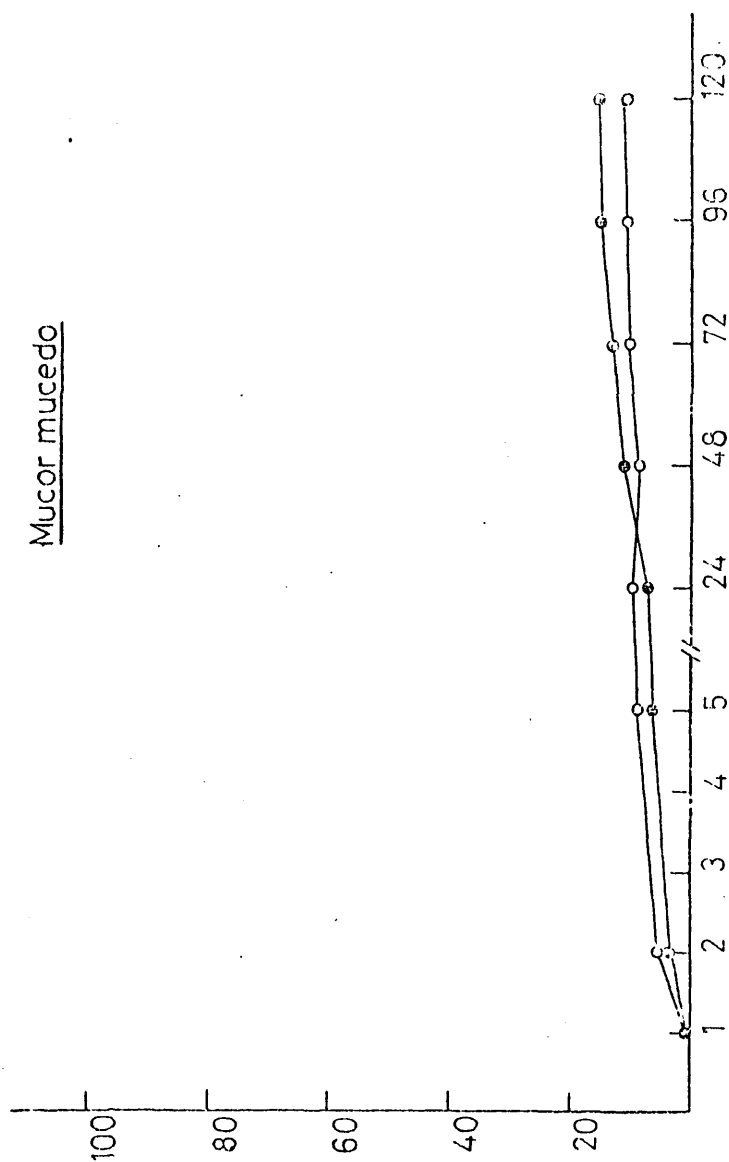
ENZIMAS	a		b		c
	mU/muestra		mU/mg proteínas		mU/mg pared
	L.C.	Ext.M.	L.C.	Ext.M.	
Quitinasa	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
β -N-acet.	5.60	0.02	1.90	60.00	1.00
Fosf. Acid.	2.00	0.04	0.60	1.50	1.70
Fosf. Alc.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
β -1-3 gluc.	1200.00	0.00	400.00	0.00	8.20
Invertasa	0.00	0.00	0.00	0.00	7.00
Celulasa	0.00	0.00	0.00	0.00	5.80
Dextranasa	180.00	0.00	60.00	0.00	11.40
Poligalact.	0.00	0.00	0.00	0.00	29.20
β -1-4 gluc.	0.00	0.00	0.00	0.00	--
β -1-6 gluc.	646.00	0.00	215.30	0.00	11.40
Amilasa	5832.00	9.10	1944.00	320.00	10.40

Los resultados son la media de tres experimentos.



112

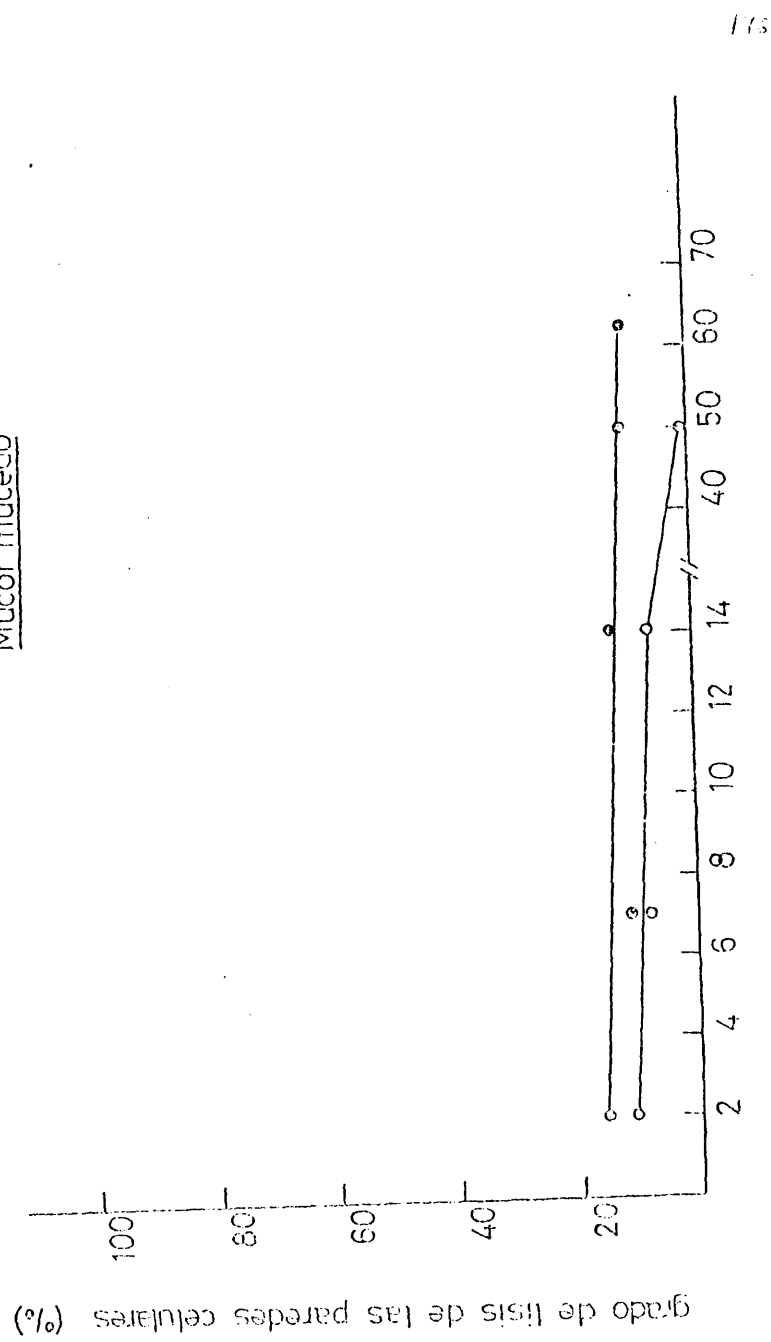
período de incubación (días) FIG. XXVI



tiempo de incubación (horas)

FIG. XXVII

Mucor mucedo



paredes de diferentes edades (días) FIG. XXVIII

Mucor mucedo

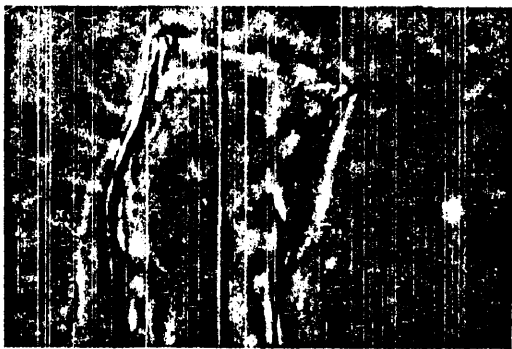


Fig.1



Fig.2



Fig.3

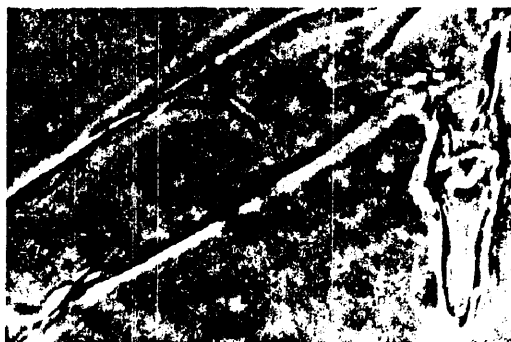
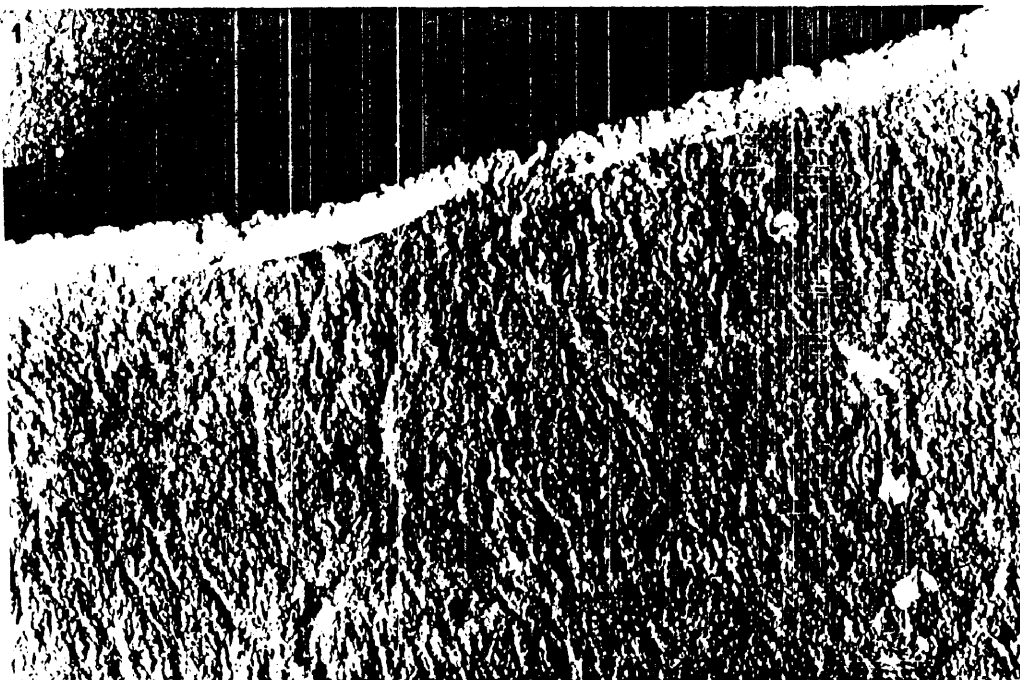


Fig.4

Mucor mucedo

Mucor mucedo

179

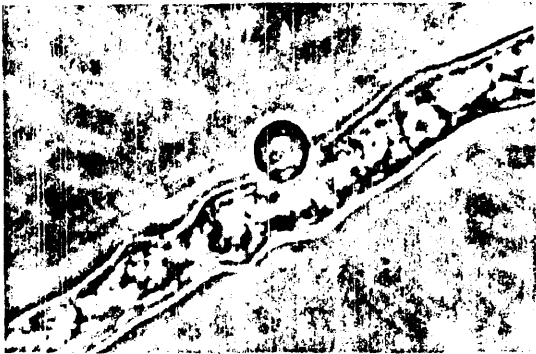


Fig.1



Fig.2



Fig.3



Fig.4



Fig.5

Fig.6

177/12

Mucor mucedo. -

Fig. 1 y 2 : Paredes celulares de 4 días observadas al microscopio óptico (contraste de fase x 1000).

Fig. 3 y 4 : Paredes celulares de 63 días (contraste de fase -- x 1000)

Foto 1 : Paredes de 7 días después de 48 horas de lisis, sombreadas con Au/Pd . Observadas al microscopio electrónico - x 38.000.

Fig. 1 a la fig.6 : Aspecto morfológico presentado por las hifas, esporas y protoplastos liberados de este hongo, observado al microscopio óptico - (contraste de fase x 1000). (ClNa 0,8 M).

1957

D I S C U S S I O N

DISCUSION

En la Fisiología de Hongos, la última fase de crecimiento, llamada fase de decadencia o autólisis (Mandels, 1965) ha sido poco estudiada, en comparación con las demás fases de crecimiento.

La iniciación de la autólisis, coincide con la desaparición de la fuente carbonada presente en el medio de cultivo (Leal y colab. 1968). Según P.H. Matile (1966), la autólisis puede ser considerada como la muerte de la célula, principalmente por falta de nutrientes; como consecuencia las enzimas líticas confinadas en los lisosomas (Thornton, 1968; Callonge y colab., 1969) son liberadas, empezando la hidrólisis de los materiales citoplasmáticos y de las paredes celulares. Esto se refleja en una pérdida gradual del peso del micelio, que generalmente se ha tomado como criterio para la medida de la autólisis (Behr, 1930; Ritter, 1955; Lahoz y colab., 1966).

Los grados de autólisis alcanzados por los diferentes hongos aquí estudiados, a los 70 días de incubación fueron:

<u>Penicillium oxalicum</u>	-----	93%
<u>Neurospora crassa</u>	-----	81%
<u>Aspergillus nidulans</u>	-----	75%
<u>Polystictus versicolor</u>	-----	76%

<u>Aspergillus niger</u> -----	50%
<u>Schizophyllum commune</u> -----	30%
<u>Mucor mucedo</u> -----	50%

El Penicillium oxalicum alcanzó el más alto grado - de autólisis y más rápidamente, de manera que cultivos de más de 14 días ya no podían ser empleados para la obtención de pa- redes celulares, por la imposibilidad de separar los pequeños trozos de paredes del material citoplasmático, procedentes am- bos de la autólisis de las hifas. Todo este material llega a desaparecer a los 40 días de incubación, quedando una masa de esporas que son estables indefinidamente. Siempre pueden ver- se en estos cultivos envejecidos y en cantidades no significa- tivas algunas hifas nuevas y otras en avanzado estado de autó- lisis, es como si los productos de la degradación celular die- ran los nutrientes necesarios para el crecimiento o regenera- ción de nuevas hifas.

Los trabajos de Trinci y Righelato (1970) sobre la autólisis del Penicillium chrysogenum, ponen de manifiesto -- que el grado de autólisis de este hongo a los seis días de -- incubación llega a ser de un 83% en cultivos en agitación. -- Este alto grado de autólisis es comparable a los obtenidos -- por nosotros para el Penicillium oxalicum en cultivo estacio- nario, aunque en este tipo de cultivo el proceso es mucho más lento, pero se sigue esta forma de cultivo porque se ha com--

probado que la producción de enzimas líticas en cultivo estacionario es siempre mayor (Reyes y colab., 1977).

En los precipitados enzimáticos procedentes de cultivos de 70 días, hay una gran diversidad de enzimas líticas intimamente relacionadas con la degradación de los polisacáridos de las paredes celulares y de los carbohidratos de reserva. La actividad específica de las enzimas relacionadas con la hidrólisis de la quitina, quitinasa y β -N-acetilglucosaminidasa, es mayor 4,2 y 1,7 veces respectivamente en los extractos de micelio que en el líquido de cultivo, ocurriendo lo contrario para la mayoría de las otras enzimas estudiadas. Las únicas enzimas encontradas en el extracto de micelio y no en el líquido de cultivo, son la fosfatasa ácida y la β -1,6-glucanasa (pustulanasa). La dextranasa solamente se ha encontrado en el líquido de cultivo.

La lisis de las paredes celulares del Penicillium oxalicum con las enzimas líticas procedentes del líquido de cultivo, ocurre más rápidamente y en mayor extensión (95%) en paredes jóvenes, que en paredes procedentes de micelios viejos (50%), análogamente a lo indicado por Polacheck y Rosenberger (1975) para paredes de Aspergillus nidulans, y por Reyes y Lahoz (1977) para paredes de Sclerotinia fructigena. Lo que hace suponer de acuerdo con los autores citados, que hay una parte de la pared más susceptible al ataque enzimático, y a medida que las paredes proceden de micelios más viejos, la

parte atacable es menor. También se puede pensar que el proceso sea más lento, de acuerdo con el alto grado de autólisis alcanzado por el micelio del Penicillium oxalicum después de 70 días de incubación, o que en las condiciones experimentales haya pérdida de alguna actividad enzimática.

La cantidad de N-acetilglucosamina y glucosa determinada en los hidrolizados de estas paredes indica que la cantidad de quitina hidrolizable al estado de N-acetilglucosamina representa en paredes jóvenes entre un 6,4 a un 8,3% del peso de la pared, y en paredes viejas de un 2,1 a un 2,3%. -- Análogamente la cantidad de glucosa encontrada indica que los glucanos hidrolizados al estado de glucosa oscilan entre un 8,4 y 11,6% del peso de la pared en paredes jóvenes y del 3,6 a 5,1% en paredes viejas.

Las enzimas "retenidas" o enzimas endógenas de las paredes del Penicillium oxalicum no producen ningún efecto lítico apreciable sobre las mismas, probablemente ello sea debido a las pequeñas actividades (ver tabla III) de quitinasa, β -N-acetilglucosaminidasa y β -1,3 glucanasa retenidas por las paredes, ya que estas enzimas pueden ser las responsables de la lisis, como ocurre en las paredes de Penicillium chrysogenum (Troy y Koffer, 1969).

La estructura de las paredes procedentes de micelio de tres días del Penicillium oxalicum está formada por micro

fibrillas entrecruzadas como puede verse en las fotografías - obtenidas por microscopía electrónica de paredes sombreadas - (Au/Pd) (Fotos 1 y 3), siendo muy semejantes a las paredes de Penicillium chrysogenum (Troy y Koffer, 1969). Estas paredes atacadas durante 24 horas con las enzimas líticas procedentes del líquido de cultivo, presentan alteraciones en las microfibrillas del retículo, mostrando grandes poros o agujeros. Un cambio en la estructura comparable a estas alteraciones ha sido observado por Troy y Koffer (1968) en Penicillium chrysogenum, cuando las paredes de cinco días son tratadas con una β -1,3 glucanasa pura producida por Bacillus circulans. Un aspecto diferente adquieren las paredes del Penicillium chrysogenum, cuando son tratadas por una quitinasa pura, producida por el Streptomyces 8-A, perdiendo como la rigidez externa de la pared. Esto en el Penicillium oxalicum es menos apreciable por la acción conjunta de ambas enzimas y probablemente por la acción más lenta de las quitinasas.

Fotografías obtenidas por microscopía electrónica - de cortes finos de paredes de 3 días antes y después de someterse a la acción enzimática, muestran claramente que en las paredes del Penicillium oxalicum se pueden distinguir hasta - cinco capas de diferente densidad electrónica (fotos 5 y 6). Hunsley y Burnett (1970) también han encontrado cinco capas - en las paredes de Neurospora crassa basándose en estudios enzimáticos y de microscopía electrónica. Estos autores también ponen de manifiesto la existencia de cuatro capas en Schizo-

phyllum commune y dos capas en Phytophthora parasitica. Laborda y colab. (1974) observaron por microscopía electrónica en Fusarium culmorum, tres capas de diferente densidad electrónica, - siendo la capa más externa, la más resistente a la acción lítica de la "strepzima FL" (Laborda y colab., 1974). En las fotografías 6, 9 y 12, también puede observarse que en la lisis de las paredes del Penicillium oxalicum con sus propias enzimas líticas, la capa exterior es la más resistente a la lisis y la menos densa al microscopio electrónico. Las fotografías 9, 10, 11 y 12, muestran como se va produciendo el ataque enzimático a diferentes alturas de la pared.

También hay que destacar los cambios estructurales - que sufre el micelio durante la autólisis. En micelio de 3 días (fotos 13, 15, 17 y 19) se observa una perfecta organización tanto del citoplasma como de la pared celular, por el contrario en micelio autolizado de 14 días se ve una gran desorganización del citoplasma y la existencia de lisis en las diferentes capas de la pared celular (fotos 14, 16, 18 y 20). Bainbridge y colab. (1971) también observaron esta desorganización en cultivos autolizados del Aspergillus nidulans.

La obtención de protoplastos de micelio joven del Penicillium oxalicum, con sus propias enzimas líticas en un medio osmóticamente estabilizado, era lógico de esperar, ya que las paredes celulares de este hongo sufrían un alto grado de lisis al ser tratadas con estas enzimas, así como por la ---

autólisis natural sufrida por este microorganismo. En la revisión bibliográfica llevada a cabo, no hemos encontrado nada - referente a la producción de protoplastos por el Penicillium oxalicum, en cambio la producción de protoplastos por el Penicillium chrysogenum ha sido estudiada por Fawcett y colab. --- (1973), Anná y colab.(1974) y Peberdy y colab.(1976). En las - condiciones fijadas para la obtención de protoplastos por el - Penicillium oxalicum y basándonos en estos estudios, la cantidad de protoplastos obtenida por mg. de peso seco de micelio, fué de $1,3 \cdot 10^5$.

La Neurospora crassa alcanzó un alto grado de autólisis (81%) análogamente a lo que ya habían comprobado Reyes y - colab.(1966).

Los precipitados enzimáticos procedentes del líquido metabólico así como del extracto de micelio de cultivos autolizados de 70 días, presentan una alta actividad específica, respecto a la β -1,3 glucanasa, invertasa y amilasa con valores de 2,2 , 2,8 y 1,7 U/mg de proteína, siendo estas actividades mayores en el líquido de cultivo que en el extracto de micelio - 8,9 , 1,9 y 9,8 veces respectivamente. También es interesante destacar que en estos precipitados todas las enzimas líticas - analizadas presentaron actividad.

La lisis de las paredes de Neurospora crassa a las - 120 horas de ataque enzimático llega a ser de un 58% en las - paredes jóvenes (4 días) obtenidas de micelios en fase de cre

cimiento, mientras que la lisis de paredes procedentes de micelios autolizados (63 días), llega a ser de un 31,2%. Es decir que las paredes jóvenes de Neurospora crassa se atacan el doble que las paredes "viejas". Paredes de diferentes edades comprendidas entre las antes citadas alcanzan un grado de lisis comprendido entre 58,1% y un 31,2% (Tabla IV).

De las enzimas líticas retenidas por las paredes celulares de 4 días de Neurospora crassa, presentan actividades apreciables (entre 8 a 40 mU/mg de pared) la β -1,3 glucanasa, invertasa, celulasa, dextranasa, poligalacturonidasa y amilasa. Aunque no se ha estudiado las enzimas retenidas por paredes de diferentes edades, sí se ha comprobado que el efecto lítico debido a estas enzimas es aproximadamente de un 10% (después de 120 horas de incubación en el tampón) en paredes hasta de 49 días. En paredes de 63 días no hay ningún efecto lítico endógeno (Tabla VI).

La estructura de las paredes de Neurospora crassa ha sido muy estudiada (Mahadevan y Tatum, 1967; Manocha y Colvin 1967 y Hunsley y Burnett 1970). Las paredes de 4 días antes y después del ataque enzimático (paredes sombreadas Au/Pd) presentan un aspecto granuloso y fibrilar respectivamente comparable con los resultados obtenidos por Manocha y Colvin (1967) antes y después de tratar las paredes de 3 o 4 días con enzimas del tracto intestinal del caracol, habiendo sido digerida principalmente la parte matriz amorfa de glucano. (fotos 1 y 2)

Bachmann y Bonner (1959) obtuvieron protoplastos de Neurospora crassa empleando enzimas de caracol en condiciones osmóticas adecuadas. Reyes y Lahoz (1976) obtuvieron protoplastos de Neurospora crassa con sus propias enzimas líticas. Aquí hemos comprobado que la producción de protoplastos es la consecuencia del grado de lisis que sufre la pared por sus propias enzimas líticas. Análogamente Manocha y Colvin (1967) estudiaron que las paredes de Neurospora crassa se atacaban por enzimas del caracol y ya Bachmann y Bonner (1959) habían obtenido protoplastos de este hongo empleando estas enzimas como ya antes hemos indicado.

La cantidad de protoplastos obtenidos por mg. de peso seco de micelio fué $6,5 \cdot 10^4$

Otro de los hongos estudiados, el Aspergillus nidulans, alcanzó un alto grado de autólisis, siendo de un 75% a los 70 días de incubación.

La quitinasa, β -1,3 glucanasa e invertasa, fueron las enzimas que tenían mayor actividad específica en el precipitado proteínico del líquido de cultivo con 386,5 , 341,3 , - y 412,7 mU/mg de proteínas. El precipitado proteínico del extracto de micelio contenía más enzimas líticas y en concentraciones superiores a las del líquido de cultivo, como le ocurre a la celulasa que se encuentra en concentraciones 4,8 veces más alta (Tabla X).

La lisis de las paredes jóvenes del Aspergillus nidulans fué de un 52,8% en paredes de 3 días y de un 22,4% en paredes de 63 días, lisándose las paredes jóvenes 2,4 veces más que las paredes viejas. La liberación de moléculas de N-acetilglucosamina y glucosa de las paredes de este hongo por la acción lítica de las enzimas, está en relación con las actividades quitinásica y β -1,3 glucanásica antes indicada, liberándose cantidades de N-acetilglucosamina algo mayores que las de glucosa excepto en la muestra de 4 días (Tabla IX).

Hay que destacar que aunque en pequeña cantidad también se detectó actividad α -1,3 glucanásica en el líquido de cultivo.

No se encuentra actividad quitinásica en las enzimas líticas retenidas por las paredes de 3 días de Aspergillus nidulans y la actividad β -1,3 glucanásica retenida fué de 8,2 mU por mg. de paredes. Probablemente debido a esto no se detectó actividad lítica endógena. Polacheck y Rosenberger (1975) por el contrario encontraron enzimas autolíticas en las paredes de las hifas del Aspergillus nidulans, su presencia la demostraron, estudiando los productos que se liberaban de las paredes, al incubar estas en tampón de fosfato.

En la revisión bibliográfica llevada a cabo para la realización de este trabajo, nada se ha encontrado sobre la estructura de la pared del Aspergillus nidulans. Nosotros he-

mos encontrado un espectacular cambio de estructura. En la fotografía 1, de paredes no sometidas a la acción lítica de las enzimas, se puede observar una trama de microfibrillas que desaparece después de ser atacadas las paredes enzimáticamente, (foto 2) adquiriendo un aspecto más granular y compacto, con algunos poros u oquedades de lisis. Esto lo interpretamos como una consecuencia lógica del mayor ataque de las microfibrillas de quitina, que de la matriz de glucano, comparable por lo obtenido por Troy y Koffler (1968) para el Penicillium chrysogenum como ya se indicó anteriormente.

Peberdy y Gibson (1971) obtuvieron protoplastos de Aspergillus nidulans con enzimas líticas de un Streptomyces RA. Análogamente a lo descrito por estos autores, nosotros comprobamos que primeramente ocurre la salida de protoplastos pequeños y no vacuolados y más tarde, la salida de protoplastos más grandes y con vacuolas. (Figuras

El número de protoplastos producidos por mg. de peso seco de micelio, fué de $9,2 \cdot 10^4$.

El Polystictus versicolor presenta un crecimiento -- lento, empezando la autólisis entre el sexto y séptimo día de incubación. El grado de autólisis alcanzado a los 63 días de incubación fué de un 76%, aunque a partir de los 21 días de -- crecimiento el peso seco del micelio permanecía prácticamente constante (Fig. XVIII).

En el precipitado proteínico procedente del líquido de cultivo, todas las enzimas analizadas presentaron actividad. La β -1,3 glucanasa, invertasa y amilasa, mostraron las actividades específicas más altas con 1157,2 , 1657,2 , 407,2 mU/mg. de proteína respectivamente (tabla XIII).

Paredes jóvenes de este hongo (4 días) alcanzaron un grado de lisis de un 56,3%, paredes de 7 días (comienzo de la autólisis del micelio) se lisaban en un 26,7% y paredes de 63 días en un 7,7%. Comparados estos resultados, parecen indicar que a los 4 días de crecimiento la composición de las paredes de este hongo tiene una parte más atacable o todavía la pared no está completamente formada; las paredes de 7 días se atacan la mitad que las anteriores y en las paredes de 63 días la mayor parte atacable de la pared ha debido lisarse durante el proceso autolítico del micelio del que proceden (tabla XI).

Las paredes de este hongo no presentan actividad lítica endógena, probablemente debido a la baja actividad retenida por mg. de pared (tabla XII). La baja o nula concentración de N-acetilglucosamina, determinada en los hidrolizados de las paredes, así como la alta concentración de glucosa, indican que hay disolución preferente de algún glucano.

Al microscopio electrónico la estructura de la pared de Polydicticus versicolor antes de ser sometida a la acción de

las enzimas líticas, presenta un aspecto muy semejante al de las paredes de Neurospora crassa (comparar fotografías 1 de Neurospora crassa con 1 de Polystictus versicolor) aquí obtenidas, y las obtenidas por Manocha y Colvin (1967). Después de ser tratadas durante 48 horas con sus enzimas líticas, en estas paredes aparece una estructura muy limpia de microfibrillas entrecruzadas posiblemente de quitina, ya que no se ha encontrado N-acetilglucosamina en los hidrolizados. Esta estructura es semejante a la de Neurospora crassa, puesta de manifiesto por Manocha y Colvin (1967), al someter las paredes de este hongo ya tratadas con enzima de caracol, a la acción de la tripsina. Nosotros pensamos que aquí puede ocurrir un efecto semejante ya que el Polystictus versicolor en las condiciones estudiadas produce una gran cantidad de enzimas proteolíticas (Reyes, Fernández y Rodríguez, 1969), que junto con las de más enzimas líticas estudiadas actúan sobre la pared poniendo de manifiesto la estructura descrita.

En la producción de protoplastos por el Polystictus versicolor, con un rendimiento de $1,3 \cdot 10^5$ protoplastos por mg. de peso seco de micelio, se obtenían protoplastos de muy diferente tamaño y contenido (Figuras, 3, 7, 8, 9, 10 y 11). Muchos protoplastos quedaban dentro de las hifas (Figuras, 2, 5, y 6) y otros como pegados a las mismas (Fig. 3), como ya había indicado Strunk (1965). Con frecuencia se observó la fusión de protoplastos (Fig. 10). de Vries y Wessels (1973) también han obtenido protoplastos de este hongo con enzimas líticas de Tri

choderma viride.

En Aspergillus niger y en las condiciones estudiadas el proceso autolítico empieza a los 5 días de incubación, llegando a los 49 días a un grado de lisis de un 50%, estable indefinidamente con el tiempo de incubación .

La mayoría de las enzimas líticas analizadas en el precipitado proteínico del líquido de cultivo, o presentaban actividades específicas muy bajas, o no presentaban actividad a excepción de la β -1,3 glucanasa y la poligalacturonidasa que presentaban actividades específicas de 1739,4 y 222,1 mU/mg de proteína respectivamente. En el extracto de micelio se encontraron mayor número de enzimas y con actividades específicas más altas, excepto para la β -1,3 glucanasa (Tabla XVI).

Los grados de lisis de las paredes de las diferentes edades, se determinaron hasta las 48 horas de hidrólisis (ver resultados) ya que hidrolizados más viejos se contaminaban sistemáticamente pese a la concentración de azida sódica. Prácticamente a las 48 horas la hidrólisis fué igual para paredes jóvenes y viejas, siendo de un 24,3% para paredes de 3 días y de un 18,5% para paredes de 63 días.

Los análisis de N-acetilglucosamina y glucosa en los hidrolizados de pared de 3 días, indican que el 0,8% de la pared hidrolizada fué quitina y el 14,0% fué glucano. El resto -

hasta el total del 24,3% de la pared hidrolizada fueron oligosacáridos o polisacáridos solubles ya que el total de carbohidratos analizados representa el 24,7% de la pared.

Las paredes de este hongo tampoco presentan actividad lítica endógena, ya que como en otros casos retienen poca actividad enzimática por mg. de pared (Tabla XVI).

En la bibliografía existente no hemos encontrado nada acerca de la ultraestructura de las paredes de Aspergillus niger, pero el aspecto que presentan las paredes antes y después de ser sometidas a la acción lítica de las enzimas, es comparable a lo observado por nosotros en Aspergillus nidulans desapareciendo parte de la estructura de microfibrillas y apareciendo una estructura más granular y con puntos de ataque -- (Fotografías 1 y 2).

Protoplastos de Aspergillus niger, habían sido obtenidos por Husilková y Fencel (1966 y 1968) y fijadas las condiciones de requerimientos y mayor producción. Siguiendo este trabajo y empleando las propias enzimas líticas del hongo, el rendimiento de protoplastos fué de $1,5 \cdot 10^5$ por mg. de peso seco del micelio, lo cual está en relación con los obtenidos por estos autores. Como puede observarse (Figuras de la 1 a la 6) algunos presentan grandes vacuolas y otros por el contrario abundante contenido citoplasmático.

El Schizophyllum commune en las condiciones descritas, crece y se autoliza muy lentamente. El comienzo de la autólisis ocurre entre los 11 y 12 días de incubación, siendo el grado de autólisis alcanzado a los 63 días de un 30%. Cultivos envejecidos de 100 a 120 días presentaron un grado de autólisis estable de un 60%. Las enzimas líticas de este hongo se obtuvieron a partir de estos cultivos de 120 días ya que en cultivos de 70 días apenas había precipitado proteínico.

Como puede verse en la tabla XX se encontró gran actividad específica para muchas de las enzimas estudiadas, siendo esta casi siempre más alta en el extracto de micelio que en el líquido de cultivo. En ambos se detectó actividad α -1,3 -- glucanásica. No se detectó quitinasa y la β -N-acetilglucosaminidasa presentó actividades de 16,9 y 8,1 mU/mg de proteína respectivamente.

La lisis de las paredes después de 120 horas de incubación fué muy uniforme para todas las muestras analizadas, -- siendo la media de un 40%. Sólomente el 10% de las paredes hidrolizadas fué determinado como azúcares, oligosacáridos o polisacáridos solubles. El otro 30% no pudo ser determinado.

La lisis endógena de las paredes fué también alrededor de un 40% en todas las muestras analizadas después de 120 horas de incubación.

La ultraestructura de las paredes del Schizophyllum commune, no sufre un gran cambio al ser tratadas con sus propias enzimas líticas. Hunsley y Burnett (1970) encontraron que el tratamiento con laminarinasa, pronasa o quitinasa, no producía ningún cambio apreciable en la pared de este hongo, salvo que reducía la claridad de las cuatro capas que forman la pared. Wessels (1965) demostró que en las paredes de este hongo, hay un β - glucano, α -1,3 glucano (Bacón y colab., 1968) que recubre la parte exterior de la hifa y hasta que éste no es extraído con KOH, la pared no se ataca por laminarinasa, quitinasa, etc. En nuestro caso encontramos en ambos precipitados -- proteínicos así como en las paredes celulares de 7 días, actividad α -1,3 glucanásica (Tabla XIX). Esta enzima aunque en -- concentraciones pequeñas, después de 120 horas de ataque puede producir algún efecto lítico. Así en la fotografía 2 podemos -- ver como agujeros redondos, no profundos, siendo esta estructura comparable a la obtenida por Hunsley y Barnett (1970), después que las paredes del Schizophyllum commune, habían sido -- tratadas con KOH y sometidas a la acción lítica de diferentes enzimas como ya hemos indicado.

Protoplastos de este hongo han sido obtenidos por de Vries y Wessels (1972) con enzimas líticas de Trichoderma viride. Los protoplastos obtenidos por nosotros a partir de este hongo con sus propias enzimas, presentan un aspecto comparable a los obtenidos por estos investigadores (Figuras, 1 a la 8),

observándose muchos de ellos dentro de las hifas (Figuras 1, 2, 3, 4, y 5) o libres en el medio (Figuras 6, 7, y 8). Estos protoplastos son de diferentes tamaños y presentan abundante contenido citoplasmático.

El número de protoplastos producido por mg. de peso seco fué de $1,2 \cdot 10^5$.

El Mucor mucedo sufre una autólisis rápida, llegando a ser el grado de lisis a los 14 días de un 45,6% y a los 20 días de un 50%, manteniéndose este valor indefinidamente constante con el tiempo de incubación.

Este hongo, en el precipitado proteínico del extracto de micelio, sólo presenta actividad enzimática de β -N-acetilglucosaminidasa y amilasa, 60,0 y 320,0 mU/mg de proteína respectivamente; también en este precipitado se encontraron indicios de fosfatasa ácida. En el precipitado del líquido de cultivo además de indicios de fosfatasa ácida, se encontraron: β -1,3 glucanasa (400 mU/mg), dextranasa (60 mU/mg), β -1,6 glucanasa (215,3 mU/mg) y amilasa (1,9 U/mg), siendo esta enzima la que se encuentra en cantidades mayores tanto en el líquido como en el micelio.

Todas estas enzimas líticas antes indicadas presentan actividad en las paredes celulares de 4 días, quedando además retenidas en estas paredes, enzimas que no han sido detectadas

en los precipitados proteínicos como son: invertasa, celulasa, y poligalacturonidasa.

El grado de lisis de la pared después de 120 horas de ataque enzimático, fué de un 15,6% para paredes de 4 días y de un 11,5% para las demás paredes (Tabla XXI).

La actividad lítica endógena de las paredes jóvenes - produce en estas un grado de lisis de un 10,3%, mientras que -- las paredes viejas no presentan actividad endógena.

Por la imposibilidad de obtener fotografías sombreadas de paredes jóvenes sin atacar enzimáticamente, de este hongo, no podemos hacer un estudio comparativo como con las otras especies, solamente podemos comparar las paredes atacadas con -- los resultados obtenidos con otros autores.

Jones y colab. (1968), estudiaron la degradación de las paredes del Mucor ramannianus por un Streptomyces, comparando -- la ultraestructura de las paredes antes y después de someterlas a la acción lítica del microorganismo, apreciándose claramente el cambio de estructura. Las paredes del Mucor mucedo presentan también surcos de ataque en menor proporción que estas. Bartnicki-García y Hickerson (1964), Bartnicki-García y Reyes (1968), estudiando las paredes de las hifas y de los esporangióforos -- del Mucor rouxii, encontraron diferencias entre las superficies externa e interna. La estructura de la pared del Mucor mucedo,

recuerda la de la cara externa, pero con más surcos de ataque.

Ramirez-León y Ruiz-Herrera (1972), obtuvieron protoplastos del Mucor rouxii; con las condiciones descritas por estos autores no se produjeron protoplastos para el Mucor mucedo. En las condiciones ya descritas la producción de protoplastos -- fué escasa en las primeras horas, llegándose a obtener el máximo rendimiento a las 24 horas de incubación ($1,2 \cdot 10^5$ protoplastos por mg. de peso seco de micelio). Los protoplastos producidos eran muy tenues y con poco contenido citoplasmático (Figuras 3, 4, 5, 6), con frecuencia al romperse dejaban en libertad vacuolas estables en el medio.

Comparando todos los resultados obtenidos, podemos -- ver que existe una relación entre el grado de autólisis alcanzado por cada hongo y el grado de lisis que experimentan sus paredes al ser tratadas con sus propias enzimas líticas.

En el Penicillium oxalicum, ambos grados son aproximadamente iguales. En los demás hongos estudiados el grado de lisis alcanzado por sus paredes es menor aproximadamente en un -- 20% que el grado de autólisis del micelio, a excepción del Mucor mucedo , en el que el grado de lisis es menor en un 35%.

Durante el proceso autolítico cada hongo produce las enzimas necesarias, para su degradación celular. De todos los

hongos estudiados, Neurospora crassa es el que mayor número de enzimas produce y con una mayor actividad específica, siendo - por el contrario el Mucor mucedo el de menor producción .

La quitinasa es una enzima que a pesar de estar implicada en la degradación de la pared no se detecta en grandes cantidades, y no fué encontrada ni en Schizophyllum commune ni en Mucor mucedo. Esta enzima presenta su mayor actividad en Aspergillus nidulans, con actividades específicas de 386,5 y 160 mU/mg. de proteína en los precipitados proteínicos del líquido de cultivo y del extracto de micelio respectivamente.

Otra enzima implicada también en la lisis de las paredes de muchos hongos, es la β -1,3 glucanasa, que se detecta en todos los precipitados proteínicos de los hongos estudiados, -- con altas actividades específicas. El hecho de la alta actividad presentada por esta enzima, junto con otras detectadas en los precipitados proteínicos, puede tener un posible interés industrial.

De todas las estudiadas, las enzimas que presentan mayor actividad lítica son las del Penicillium oxalicum, lo cual no sólo se manifiesta en la lisis de sus propias paredes, sino en la degradación producida por estas enzimas, sobre las paredes de los demás hongos.

Los cambios estructurales que experimenta la pared co

lular, durante la hidrólisis con sus enzimas líticas, ocurren de manera espectacular en Penicillium oxalicum, con la aparición de grandes poros u oquedades en las microfibrillas del retículo. En Neurospora crassa y Polystictus versicolor ; la estructura se hace más esponjosa y fibrilar después del ataque enzimático. Tanto en Aspergillus nidulans como en Aspergillus niger, la trama de microfibrillas desaparece, aunque en menos grado en este último. En Schizophyllum commune, el ataque enzimático se manifiesta por la aparición de pequeños poros y en Mucor mucedo por la aparición de surcos entre las microfibrillas.

En todos los hongos estudiados , al tratar el micelio joven de cada uno con sus propias enzimas líticas, se producen protoplastos con un rendimiento muy análogo entre ellos.

26/12

CONCLUSIONES

- 1 - Entre las diferentes especies estudiadas, el grado de autólisis más elevado, fué el alcanzado por Penicillium oxalicum, siendo de un 93 %.
- 2 - En todos los casos estudiados, las actividades enzimáticas valoradas, fueron siempre mayores en el precipitado proteínico del líquido de cultivo, que en el del extracto de micelio, a excepción del Schizophyllum commune, en el que -- ocurre el caso contrario.
- 3 - De todos los hongos estudiados, Neurospora crassa es la -- que produce mayor número de enzimas y con más alta actividad específica.
- 4 - Entre las enzimas detectadas en el precipitado proteínico del Penicillium oxalicum, la β -1,3 glucanasa, presentó la máxima actividad específica, siendo de 919,0 mU/mg de proteína.
- 5 - En el precipitado proteínico de Neurospora crassa, las actividades enzimáticas más elevadas corresponden a la invertasa y β -1,3 glucanasa, con 2,8 y 2,2 U/mg de proteína respectivamente.
- 6 - En Aspergillus nidulans, la quitinasa presentó una activi--

dad de 386,9 mU/mg de proteína, siendo esta la actividad ---
quitinásica más alta obtenida, entre todos los hongos estu-
diados.

- 7 - En el precipitado proteínico del Polystictus versicolor, --
las actividades más altas alcanzadas, fueron las de la ----
 β -1,3 glucanasa e invertasa, siendo de 1,2 y 1,7 U/mg de --
proteína respectivamente.
- 8 - En Aspergillus niger, la máxima actividad valorada en su --
precipitado proteínico, fué la correspondiente a la β -1,3 -
glucanasa con 1,7 U/mg de proteína.
- 9 - En Schizophyllum comune, la máxima actividad enzimática en
contrada en el precipitado proteínico del extracto de mico-
lio, fué para la celulasa con 1,2 U/mg de proteína.
- 10 - En el precipitado proteínico del líquido de cultivo del --
Mucor mucedo, la máxima actividad enzimática detectada co-
rrespondió a la amilasa, con 1,9 U/mg de proteína.
- 11 - Todos los hongos estudiados experimentaron lisis de las pa-
redes celulares, al ser tratados con sus propias enzimas -
líticas.

- 12 - La lisis celular presentada fué siempre mayor en las paredes jóvenes.
- 13 - De todos los hongos estudiados el que presentó el mayor grado de lisis de sus paredes celulares, fué el Penicillium oxalicum con un 95,5 %.
- 14 - Después de la hidrólisis enzimática, las paredes celulares de todos los hongos, presentan cambios estructurales.
- 15 - El cambio estructural máximo observado, fué en las paredes del Penicillium oxalicum.
- 16 - En cortes ultrafinos de paredes celulares jóvenes de Penicillium oxalicum, se llegaron a observar hasta cinco capas en la estructura interna de la pared.
- 17 - De todas las capas celulares que forman parte de la estructura interna de la pared, la capa externa fué la más resistente al ataque enzimático.
- 18 - En cortes ultrafinos de micelio, se observa que durante el proceso autolítico del Penicillium oxalicum, ocurre un cambio estructural, tanto del contenido citoplasmático como de la pared celular.

- 19 - En todos los hongos estudiados, se han obtenido protoplas-
tos por tratamiento del micelio joven de cada uno de ellos
con sus propias enzimas líticas, en condiciones osmóticas
adecuadas.
- 20 - El rendimiento de protoplastos producidos, fué muy análogo
go en todas las especies estudiadas.

B I B L I O G R A F I A

- Ainsworth, G.C. (1973). "The Fungi", vol. IV A y IV B. Edited by G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman. Academic ---- Press. New York. London.

- Albertsson, P.A. (1967). "Two-Phase Separation of Viruses". -- Methods in Virology, 2, 303-321.

- Anne, J. Eyssen, H. y De Somer, P. (1974). "Formation and rege-
neration of Penicillium chrysogenum protoplats". Arch. Micro--
biol, 98, 159-166.

- Archer, S.A. y Fielding, A.H. (1975). "Thermostable polygalac-
turonase secreted by Sclerotinia fructigena". J. of Food Scien-
ce, 40, 423-424.

- Aronson, J.M. y L. Machlis. (1959). "The chemical composition -
of the hyphal walls of the fungus Allomyces". Am. J. Botany, 46,
292-300.

- Aronson, J.M. "The Fungi". (1965). 49-76. Edited by Ainsworth,-
G.C. , Sussman, A.S. Academic Press, New York. London.

- Bacon, J.S.D., Jones, D., Farmer, V.C. y Webley, D.M. (1968). -
"The occurrence of α -1-3 glucan in Cryptococcus, Schizosaccharo
myces and Polyporus species, and its hydrolysis by a Streptomy
c culture filtrate lysing cell walls of Cryptococcus". Bio---

chim. Biophys. Acta, 158, 313-315.

- Bachmann, B.J. y Bonner, D.M.(1959). "Protoplasts from Neurospora crassa". J.Bacteriol, 78, 550-556.
- Bainbridge, B.W., Bull, A.T., Pirt, S.J., Rowley, B.I. y Trinci A.P.J.(1971). "Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolysing cultures of Aspergillus nidulans Trans. Br. mycol. Soc, 56, 371-385.
- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J.(1962). "Insolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of Mucor rouxii. Biochim. Biophys. Acta, 58, 102-119.
- Bartnicki-García, S. y Reyes, E. (1964). "Chemistry of spore wall differentiation in Mucor rouxii". Arch. Biochem. Biophys, 108, 125-133.
- Bartnicki-García, S. (1966). "Chemistry of hyphal walls of Phytophthora". J.Gen.Microbiol., 42, 57-69.
- Bartnicki-García, S. (1968). "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi". Ann. Rev. Microbiol, 22, 87-108.

Bartnicki-García, S. y Reyes, E. (1968). "Chemical composition of sprangiophore wall of Mucor rouxii". Biochim. Biophys. Acta, 165,

32-42.

- Behr, J. (1930). "Über Autolyse bei Aspergillus niger". Arch. - Microbiol., 1, 418-444.
- Blank, F. (1953). "The chemical composition of the cell walls - of dermatophytes". Biochim. Biophys. Acta, 10, 110-113.
- Braconnot, H. (1811). "Recherches analytiques sur la nature des champignons". Ann. Chim, 79, 265-304.
- Brenner, S., Dark, F.A., Gerhardt, P., Jeyns, M.H., Kandler, O. Kellenberger, E., Klieneberger-Nobel, E., Mc. Quillen, K., Rubio-Huertos, M., Salton, M.R.J., Strange, R.E., Tomcsik, J., y Weisbull, C. (1958). "Bacterial protoplasts". Nature, Lond, - 181, 17-13.
- Brightwell, R. y Tappel, A. (1968). "Lysosomal Acid Pyrophosphatase and Acid Phosphatase". Arch. Biochem. Biophys, 124, 333-334.
- Brown, R.G. y Nickerson, W.J. (1965). "Composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of Aureobasidium (Pullularia) pullulans". Bacteriol. Proc, 26.
- Brown, R.G. y Lindberg, B. (1967). "Polysaccharides from cell walls of Aureobasidium (Pullularia) pullulans". Acta. Chem. ---

Scand, 21, 2383-2389.

- Calonge, F.D., Fielding, A.H. y Byrde, R.J.W. (1969). "Multivesicular bodies in Sclerotinia fructigena and their possible relation to extracellular enzyme secretion". J. Gen. Biol, 55, -- 177.
- Clark, W.M., Lubs, H.A. (1917). "The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its applications in bacteriology". J. Bact, 2, 1.
- Crook, E.M. y Johnston, I.R. (1962). "The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi". Biochem. J, 83 325-331.
- Fawcett, P.A., Loder, P.B., Duncan, M.J., Beesley, T.J. y Abraham, E.P. (1973). "Formation and properties of protoplasts from antibiotics-producing strains of Penicillium chrysogenum and -- Cephalosporium acremonium". J. Gen. Microbiol, 79, 293-309.
- Frey-Wyssling, A. y Mühlethaler (1950). "Der submikroskopische feinebau von chitinzellwänden Vierteljahresschr". Naturforsch. - Ges. Zurich, 95, 45-52.
- Gancedo, J.M., Gancedo, C., Asensio, C. (1966). "Uronic acids in fungal cell walls", Biochem. Z, 346, 328-332.

- Gola, Negri, y Coppelletti. (1965). "Tratado de Botánica".

- Gomez, P., Reyes, F. y Lahoz, R. (1977). "Effects of the level of the carbon source on the activity of some lytic enzymes released during autolysis of Aspergillus niger". Mycopath, 62, 23-30.

- Hughes, R.C. (1971). "Autolysis of Bacillus cereus cell walls and insolation of structural components". Biochem. J, 121, 711-802.

- Hunsley, D. y Burnett, J.H. (1970). "The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi". J. Microbiol, 62, 203-218.

- Hurst, H. (1952). "An electron diffraction study of the structure and orientation of lipids in yeast and bacterial cell walls". J. Exptl. Biol, 29, 30-53.

- Jeuniaux. (1966). "Chitinases". Methods in Enzymology, 8, 644-650.

- Johnston, I.R. (1965). "The composition of the cell wall of Aspergillus niger". Biochem. J, 96, 651-658.

- Jones, D., Bacon, J.S.D., Farmer, V.C. y Webley, D.M. (1968). - "Lysis of

- "Lysis of cell walls of Mucor ramannianus Möller by a Streptomyces sp.". Antonie van Leeuwenhoek, 34, 173-182.
- Ko, W. y Lockwood, J.L. (1970). "Mechanism of lysis of fungal mycelia in soil". Phytopath, 60, 148-154.
- Kregel, D.R. (1954). "Observations on cell walls of yeasts and -- some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests". Biochim. Biophys. Acta, 13, 1-9
- Laborda, F., García-Acha, I., Uruburu, F. y Villanueva, J.R. --- (1974). "Structure of conidial walls of Fusarium culmorum". Trans.. Br.mycol. Soc, 62, 557-566.
- Laborda, F., García-Acha, I. y Villanueva, J.R. (1974). "Studies on a Streptzyme capable of obtaining protoplasts from Fusarium culmorum conidia". Trans. Br. mycol. Soc, 62, 509-518.
- Lahoz, R., Reyes, F. y Beltrá, R. (1966). "Some chemical changes in the mycelium of Aspergillus flavus during autolysis". J. Gen. Microbiol, 45, 41-49.
- Lahoz, R., Reyes, F., y Pérez Leblic, M.I. (1976). "Lytic enzymes in the autolysis of filamentous fungi". Mycopath, 60, 45-49.
- Lahoz, R., Reyes, F., Gomez, P. y Jimeno, L. (1978). "Influence

- of the carbon/nitrogen relationship on the degree of autolysis of Aspergillus niger". Canad. J. of Botany, 56, 1806-1808.
- Leal, J.A., Lilly, V.G. y Gallegly, M.E. (1968). "The production of indolelactic acid from L-tryptophan by species of Phytophthora". Can. J. Microbiol, 14, 595-600.
 - Lowry, O.H., Rosebrong, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.S. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J. Biol. Chem, 193, 265.
 - Mahadevan, P.R., Tatum, E.L. (1965). "Relationship of the major constituents of the Neurospora crassa cell wall to wild-type and colonial morphology. J.Bacteriol, 90, 1073-1081.
 - Mahadevan, P.R., y Tatum, E.L. (1967). "Localitation of structural polymers in the cell wall of Neurospora crassa". J. of cell. Biol, 35, 295-302.
 - Mandels, R.G. (1965). "The Fungi", 1. Edited por Ainsworth, G.C. y Sussman, A.S. Academic Press, N.Y. 559.
 - Manocha, M.S., Colvin, J.R. (1967). "Structure and composition of the cell wall of Neurospora crassa". J.Bacteriol, 94, 102-112.
 - Matile, P.H. (1969). "Lysosomas in Biology and Pathology".

14A, Edited por Aingle, J.J. y Honor, B.F. North-Holland Research monographs frontieres of Biology, cap. 14.

- Mc.Lellan, W., Mc.Daniel, L.E. y Lampen, J.O. (1970). "Purification of phosphomannanase, and its action on the yeast cell wall". J.Bacteriol, 102, 261-270.
- Mc.Quillen, K (1960). In "The Bacteria". Eds. I.C. Gunsalus - and R.Y. Stanier. Vol. I, 249. Academic Press, New York.
- Metzemberg, R.L. (1962). "The localization of b-fructofuranosidase in Neurospora". Arch. Biochem. Biophys, 96, 468-474.
- Middlebrook, M.J., y Preston, R.D. (1952). "Spiral growth and spiral structure III wall structure in the growth zone of phycomyces". Biochim. Biophys. Acta, 9, 32-48.
- Mitchell, R. y Sabar, N. (1966). "Autolytic enzymes in fungal cell walls". J. of Gen. Microbiol, 42, 39-42.
- Musilkova, M. y Fencl, Z. (1966). "Formation of protoplasts in Aspergillus niger". Fol. Microbiol, 11, 472.
- Musilkova, M. y Fencl, Z. (1968). "Some factors affecting the formation of Protoplasts in Aspergillus niger". Folia Microbiol, 13, 235-239.

- Nabel, K. (1939). "Über die membran niederer pilze, beson----
ders von Rhizidiomyces bivellatins nov. spez." Arch. Mikro---
biol, 10, 515-541.
- Nelson, N. (1944). "Aphotometric adaptation of the Somogyi me-
thod for the determination of glucose". J.Biol. Chem, 153, --
375-380.
- Nickerson, W.J.O. (1963). "Symposium on biochemical bases of
morphogenesis in fungi IV molecular bases of form in yeasts".
Bacteriol. Rev, 27, 305-324.
- Novaes-Ledieu, M., Jiménez-Martínez, A., Villanueva, J.R. ---
(1967). "Chemical composition of hyphal wall of Phycomycetes".
J.Gen. Microbiol, 47, 237-245.
- Odier, A. (1823). "Memoires sur la composition chimique des -
parties cornées des insectes". Mem. Soc. Hist. Nat. Paris, 1,
29-42.
- Peberdy, J.F. y Gibson, R.K. (1971). "Regeneration of Aspergi-
llus nidulans protoplasts". J. of Gen. Microbiol, 69, 325-330.
- Peberdy, J.F. (1972). "Protoplasts from fungi". Sci. Prog. --
oxf, 60, 73-86.

- Peberdy, J.F., Buckley, C.E., Daltrey, D.C. y Moore, P.M. --- (1976). "Factors affecting protoplasts release in some filamentous fungi". Trans. Br. mycol. Soc, 67, 23-26.
- Peberdy, J.F., (1978). "Protoplasts and their Development the filamentous fungi". III, 119-131. Edited by Smith, E., and Berry, D.R. Arnold, E. (Publishers) Ltd. London.
- Polacheck, Y. y Rosenberger, R.F. (1975). "Autolytic enzymes in hyphae of Aspergillus nidulans . Their action on old and newly formed walls" J.Bacter, 121, 332-337.
- Potfieter, H.J. y Alexander, M. (1965). "Polysaccharide components of Neurospora crassa hyphal walls". Canad. J. of Microbiol, 11, 122-125.
- Potfieter, H.J., y Alexander, M. (1966). "Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis". J.Bacteriol, 91, 1526-1532.
- Ramírez-León, I.F. y Ruíz-Herrera, J. (1972). "Hydrolysis of walls and formation of sphaeroplasts in Mucor rouxii". J. of Gen. Microbiol, 72, 281-290.
- Reyes, F., Fernández, M.C. y Rodríguez, D. (1969). "Aislamiento y purificación parcial de enzimas proteolíticas del -

- Polystictus versicolor". Abstract. del II Congreso Nacional de Microbiología.
- Reyes, F. y Byrde, R.J.W. (1973). "Partial purification and -- properties of a β -N-acetilglucosaminidase from the fungus Sclerotinia fructigena". Biochem. J, 131, 381-388.
 - Reyes, F. y Lahoz, R. (1976). "Liberation of protoplasts from - mycelium of Neurospora crassa by means of enzymes obtained --- from autolyzed cultures of this fungus". Antonie van Leeuwen--hoek, 42, 457-460.
 - Reyes, F. y Lahoz, R. y Córnago, P. (1977). "Autolysis of Neurospora crassa in different culture conditions and release of β -N-acetylglucosaminidase and chitinase". Trans. Br. mycol. -- Soc, 68, 357-361.
 - Reyes, F. y Lahoz, R. (1977). "Variation in lysis walls of Sclerotinia fructigena with age of culture" J. Gen. Microbiol., 98 607- 610.
 - Reynolds, E.S. (1963). "The use of lead citrate at night pH as electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol, 17, 208.
 - Ritter , R. (1955). " Physiologische untersuchungen an Zygomyceten ". Arch. Mikrobiol, 22, 248-284

- Roelofsen, P.A. (1951). "Cell wall structures in the growth-- zone of *Phycomyces* sporangiophores II. Double refraction and electron microscopy". *Biochim. Biophys. Acta*, 6, 357-373.
- Ruiz-Herrera, J. (1967). "Chemical components of the cell wall of *Aspergillus* species". *Arch. Biochem. Biophys.*, 122, 118-125.
- Salton, M.R.J. (1961). "Microbial cell walls". 94. Wiley, New York.
- Shibata, y Nisizawa, K. (1965). *Arch. Biochem. Biophys.*, 109, - 516.
- Skujas, G.P. (1966). "Structure and composition of Zoosporangia discharge papillae in the fungus *Allomyces*". *Amer. J. Botany*, 53, 1006-10011.
- Skujins, J.J., Potgieter, H.J, y Alexander, M. (1965). "Dissolution of fungal cell walls by a *Streptomyces* chitinase and b-1-3 glucanase.
- Somogyi, M. (1945). "A new reagent for the determination of - sugars". *J. Biol. Chem.*, 160, 61-73.
- Strunk, C. (1965). "Über Entstehung und Reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polystictus versicolor*". *Biol. Rundsch*

3, 242-244.

- Strunk, C. (1967). "Symposium Über Hefe-Protoplasten", Jena -- (1965). Ed. by R. Müller. 213. Akademie-Verlag, Berlin.
- Strunk, C. (1970). "Protoplasts of moulds the present state - of knowledge. In Proceeding International Symposium of yeast - protoplasts (Burno), 107-109. Edited Necas, O. y Suoboda, A. Burno: University J.E. Purkyne.
- Summer, J.B. y Howell, S.F. (1935). J. Biol. Chem, 108, 51.
- Teorell, T. y Stenhagen, E. (1938). "Ein Universal Buffer für den pH Bereich 2,0 bis 12,0". Biochem. Z, 299, 466-419.
- Thomas, R.C. (1928). "Composition of fungus hyphae I. The Fusaria. Am. J. Botany, 15, 537-547.
- Thomas, R.C. (1930). "Composition of fungus hyphae II. The Sclerotinia". Am. J. Botany, 17, 779-787
- Thomas, R.C. (1942). "Composition of fungus hyphae III. The - Pythiaceae". Ohio J. Sci, 42, 60-62.
- Thomas, R.C. (1943). "Composition of fungus hyphae IV. The Phytophthora". Ohio J. Sci, 43, 135-138

- Thornton, R.M. (1968). "Fine structure of Phycomyces, I autophagic vesicles". J. Ultrastruc. Research, 21, 269.
- Tracey, M.V. (1943). "Chitin". Modern Methods of Plant Analysis, 2, 264-274.
- Trager, W. (1932) y Ziesel (1931). Biochem. J, 26, 1762.
- Trevelyan, W.E. y Harrison, J.S. (1952). "Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates". Biochem. J. 50, 298-303.
- Trinci, A.P.J. y Righelato, R.C. (1970). "Changes in constituents and ultrastructure of Hyphal compartments during Autolysis of glucose starved Penicillium chrysogenum". J. Gen. Microbiol, 60, 239-249.
- Troy, F.A. y Koffer, H. (1969). "The chemistry and molecular architecture of cell walls of Penicillium chrysogenum". The J. Biol. Chem, 244, 5563-5576.
- Villanueva, J.R. (1966). In "The Fungi". Eds. Ainsworth, G.C. y Sussman, A.S., II, 3. Academic. Press, London and New York.
- Villanueva, J.R. y García-Acha, I. (1971). "Production and use of fungal protoplasts". Methods in Microbiology, 4, cap. - 24, 665-718.

- de Vries, O.M.H. y Wessels, J.G.H. (1972). "Release of protoplasts from Schizophyllum commune by a lytic enzyme preparation from Trichoderma viride. J. of Gen. Microbiol., 73, 13--22.
- de Vries, O.M.H. y Wessels, J.G.H. (1973). "Effectiveness of a lytic enzyme preparation from Trichoderma viride in releasing spheroplasts from fungi, particularly Basidiomycetes" Antonie van Leeuwenhoek, 39, 397-400.
- Webster, J. (1970). "Introduction to Fungi". Published by the Syndies of the Cambridge University Press.
- Weibul, C. (1953). "The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme" J. Bact, 66, 688-696.
- Wessels, J.G.H. (1965). "Morphogenesis and biochemical processes in Schizophyllum commune". Wentia, 13, 1-113.
- Wettstein, F. (1921). "Das Vorkommen von Chitin und seine Verwertung als Systematisch-phylogenetisches Merkmal im Pflanzenreich". Sitzber. Akad. Wiss. Wien. Math-Naturw, K.L. Abt, 1, -130, 3-20.
- van Wisseling, C. (1898). "Mikrochemische Untersuchungen Über

die zellwände der Fungi". Jahrb. Wiss. Botan, 31, 619-687.

- Wollen, J.W., Heywoth, R. y Walker, P.G. (1961). "Studies on glucosaminidase, 3 Testicular N-acetyl- β glucosaminidase -- and N-acetyl β galactosaminidase". Biochem. J., 78, 111-116.
- Zonneweld, B.J.M. (1971). "Biochemical analysis of the cell wall of Aspergillus nidulans". Biochim. Biophys. Acta., 249, 506-514.

